GHEORGHE MENCINICOPSCHI
IOAN DAVID
ELENA BARON

CALITATEA ALIMENTULUI. DOZAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE. METODE DE ANALIZĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR UTILIZATE ÎN FABRICAREA ALIMENTELOR

EDITURA MIRTON

III 31.567

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

103

Prof. univ. dr. MENCINICOPSCHI GHEORGHE
Lector dr. ing. DAVID IOAN
Biochimist BARON ELENA

CALITATEA ALIMENTULUI. DOZAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE. METODE DE ANALIZĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR UTILIZATE ÎN FABRICAREA ALIMENTELOR

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Editura MIRTON Timişoara, acreditată CNCSIS.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
MENCINICOPSCHI, GHEORGHE
Calitatea alimentului : dozarea activităţii enzimatice, metode de analiză a activităţii enzimelor utilizate în fabricarea alimentelor / prof. univ. dr. Gheorghe Mencinicopschi, lect. dr. ing. Ioan David, biochimist Elena Baron. - Timişoara : Mirton, 2008
Bibliogr.
ISBN 978-973-52-0422-8

I. David, Ioan
II. Baron, Elena

614.31:664

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Prof. univ. dr. MENCINICOPSCHI GHEORGHE
Lector dr. ing. DAVID IOAN
Biochimist BARON ELENA

519440

CALITATEA ALIMENTULUI. DOZAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE. METODE DE ANALIZĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR UTILIZATE ÎN FABRICAREA ALIMENTELOR

ALE
444480
B.C.U. IASI

EDITURA MIRTON
Timişoara, 2008

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. APR. 2009

CUPRINS

PREFAȚĂ 9

Cap. I. – CALITATEA ALIMENTULUI 11

1. Alimentul – matricea alimentară 16

2. Alimentul şi informaţia alimentului. ADN-ul şi genele – genomica–transcriptomică 18
   2.1. Proteomica 20
   2.2. Metabolomica 22
   2.3. Nutrigenomica – informaţia matricei alimentare 28

3. Informaţia alimentului, factor epigenetic major 30
   3.1. Interacţiunile gene – dietă 34
   3.2. Factorii de transcripţie genetică 35
   3.3. Receptorii celulari 35

4. Alimentaţia şi stabilitatea ARN_m 37
   4.1. Alimentaţia şi biosinteza proteinelor prin translaţia ARN_m 38
   4.2. Dieta şi modificările post – transcripţionale ale proteinelor 38
   4.3. Variabilitatea genetică a populaţiilor umane şi dieta 39

5. Biologia microorganismelor producătoare de enzime 44
   5.1. Metabolismul microbian 44
   5.2. Metabolismul energetic 46
   5.3. Biosinteza proteinelor 48
   5.4. Morfogeneza proteinelor 49
   5.5. Reglarea sintezei şi activităţii enzimelor 49
   5.6. Represia sintezei enzimelor 50
   5.7. Represia prin catabolit 51
   5.8. Inhibiţia activităţii enzimelor (inhibiţia prin produs final, retroinhibiţia sau inhibiţia prin feedback) 51

6. Cinetica reacţiilor enzimatice 52
   6.1. Dependenţa de pH a vitezei reacţiilor enzimatice 53
   6.2. Dependenţa de temperatură a vitezei reacţiilor enzimatice 53

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.3. Inhibiția catalizei enzimatice 53
6.4. Activatorii catalizei enzimatice 54
6.5. Specificitatea catalizei enzimatice 54

7. Biosinteza industrială a enzimelor 54
7.1. Etapele elaborării tehnologiilor de biosinteză a enzimelor 55
7.2. Sisteme de biosinteză a enzimelor 58
7.2.1. Bioreactoare pentru procedeul culturilor de suprafață 59
7.2.2. Bioreactoare pentru procedeul culturilor submerse 59
7.3. Cinetica procesului de biosinteză – biocinetică 60
7.3.1. Dinamica multiplicării populațiilor bacteriene 61
7.3.2. Medii de cultură 61

8. Procese și aparate în obținerea industrială a enzimelor 62
8.1. Procese de sterilizare în industria de biosinteză a enzimelor 62
8.1.1. Sterilizarea prin căldură uscată 63
8.1.2. Sterilizarea prin căldură umedă 63
8.1.3. Sterilizarea prin raze ultraviolete, catodice, gamma, unde ultrasonice 64
8.1.4. Sterilizarea prin agenți chimici 64
8.2. Sterilizarea mediilor de biosinteză 64
8.2.1. Teoria generală a sterilizării 64
8.2.2. Sterilizarea termică a mediilor 65
8.2.3. Sterilizarea discontinuă a mediilor 65
8.2.4. Sterilizarea continuă a mediilor 65
8.3. Agitarea, aerarea și transferul de masă în cazul reactoarelor de biosinteză 66
8.4. Operarea industrială a reactoarelor de biosinteză 67
8.4.1. Obținerea inoculului standardizat 67
8.4.1.1. Inocularea mediului de cultură 67
8.4.1.2. Influența proporției inoculului în raport cu mediul asupra proceselor biotehnologice 68
8.4.2. Prelevarea în mod steril a probelor din bioreactoare 70
8.4.3. Prelucrarea mediilor de biosinteză 70
8.4.4. Filtrarea mediilor de biosinteză 70
8.4.5. Dezagregarea celulelor de microorganisme 71
8.4.6. Concentrarea mediilor de biosinteză 72
8.4.6.1. Concentrarea și purificarea preparatelor enzimatice prin ultrafiltrare și osmoză inversă 73
8.4.6.2. Utilizările ultrafiltrării în industria preparatelor enzimatice ... 73
8.4.6.3. Precipitarea preparatelor enzimatice 73
8.5. Tehnologii enzimatice în industria alimentară 74
8.5.1. Tehnologii enzimatice în industria amidonului 74
8.5.1.1. Nomenclatură și definiții în industria hidrolizatelor de amidon 74
8.5.1.2. Fabricarea dextrinei pe cale enzimatică 75
8.5.1.3. Fabricarea maltodextrinelor 75
8.5.1.4. Fabricarea siropului cu conținut ridicat de maltoză și a siropurilor de conversie înaltă 76

8.5.1.5. Fabricarea glucozei pe cale enzimatică 76
8.5.1.6. Fabricarea zahărului total 78
8.5.1.7. Tehnologia fabricării izosiropului HFCS – High Fructose Corn Syrup 79
8.5.2. Tehnologii enzimatice în industria spirtului şi a berii 79
8.5.2.1. Fabricarea spirtului utilizând preparate enzimatice 79
8.5.2.2. Fabricarea berii utilizând preparate enzimatice 81
8.5.3. Utilizarea carbohidraţilor pentru fabricarea biomasei şi a etanolului. Bioenergetica 82
8.5.3.1. Prelucrarea enzimatică a celulozelor 82
8.5.3.2. Bioconversia altor carbohidraţi în biomasă şi etanol 83
8.5.3.3. Utilizare zerului pentru fabricarea proteinelor şi a etanolului 83
8.5.4. Preparate enzimatice pectolitice 84
8.5.4.1. Biosinteza şi utilizările preparatelor enzimatice pectolitice ... 84
8.5.4.2. Utilizarea enzimelor pectolitice în industria sucurilor de fructe 84
8.5.4.3. Utilizarea preparatelor enzimatice pectolitice în industria vinurilor 85
8.5.5. Preparate enzimatice proteolitice (proteaze) 85
8.5.6. Biosinteza glucozoxidazei 87
8.5.6.1. Utilizările glucozoxidazei 88
8.5.6.2. Utilizările catalazei 88
8.5.7. Enzime imobilizate 89
8.5.7.1. Tehnici de imobilizare a enzimelor 90

Cap. II. – DOZAREA ACTIVITĂŢII ENZIMATICE. METODE DE ANALIZĂ A ACTIVITĂŢII ENZIMELOR UTILIZATE ÎN FABRICAREA ALIMENTELOR 93

1. Dozarea activităţii glucozoxidazei (metoda volumetrică Underkofler) 93
1.1. Metoda rapidă de determinare a activităţii glucozoxidazei în preparate lipsite de catalază 94

2. Dozarea activităţii glucanazei (metoda Novo) 96

3. Dozarea activităţii peroxidazei 99

4. Dozarea activităţii celulozolitice C_x în medii de cultură şi preparate celulozolitice 101

5. Dozarea activităţii proteazei (metoda Anson modificată) 105

6. Dozarea activităţii catalazei (metoda Sigma) 110

7. Dozarea activităţii catalazei (metoda Baker) 111

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. Dozarea activității amiloglucozidazei 113

9. Dozarea activității pectinazei microbiene 115

10. Dozarea activității celulozolitice C_1 în medii de cultură și preparate celulozolitice 117

11. Dozarea activității β – glucanazei după ABM Chemical Ltd 122

12. Dozarea activității α – amilazei 125

BIBLIOGRAFIE 129

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Bioingineria este un domeniu relativ nou care promovează aplicarea pe scară largă a unui nou tip de industrie, bazat pe fenomenele biologice.

Biologia modernă începe astfel să determine principalele direcții ale unor dezvoltări interdisciplinare, utilizând intensiv cuceririle din chimie, fizică, matematică, inginerie. La confluența acestora, a luat naștere o nouă ramură științifică, de mare viitor, biotehnologia – bioingineria. Acest domeniu deosebit de complex și vast promovează aplicarea pe scară largă a unui tip principal nou de industrie, bazat pe fenomenele biologice.

În cadrul bioingineriei s-au conturat domenii de activitate ca:

- *Ingineria producerii preparatelor enzimatice (Enzyme engineering);*
- *Ingineria producerii alimentelor (Food engineering);*
- *Ingineria aplicațiilor medicale (Medical engineering);*
- *Ingineria mediului înconjurător (Environmental engineering).*

Bioingineria s-a dezvoltat în special în legătură cu procesele de biotransformare (biosinteză-biodegradare), pentru obținerea antibioticelor, enzimelor, vitaminelor, aminoacizilor, acizilor organici, biocarburanților, biopolimerilor prin colaborarea dintre microbiolog, biochimist, inginerul chimist, utilajist, automatist, domeniu desemnat în literatura străină prin Microbial engineering și Biochemical engineering.

Industria fabricării preparatelor enzimatice microbiene utilizate în scopuri practice a început să se dezvolte rapid.

Această dezvoltare este determinată și de avantajele utilizării biocatalizei enzimatice în cele mai diverse domenii de activitate: industria alimentară, chimico-farmaceutică, textilă, pielăriei, zootehnie, medicină umană și veterinară, agricultură, cercetare, protecția mediului.

Preparatele enzimatice microbiene pot fi obținute în cantități nelimitate, microorganismele prezentând mai multe avantaje față de sursele de enzime de origine vegatală și animală.

B.C.U. "M. EMINESCU" IAȘI

Datorită extraordinarei viteze de înmulțire a microorganismelor, biosinteza enzimelor la scară industrială devine economică, iar utilizarea preparatelor enzimatice obținute oferă avantaje datorită vitezei ridicate de cataliză, înalt specifică, în condiții aproape normale de pH, temperatură, presiune.

În acest mod se evită coroziunea utilajelor. Procesele enzimatice pretându-se automatizării, conduc la scăderea consumurilor la combustibil şi energie.

Datorită specificității de acțiune a enzimelor (biocatalizatori naturali) asupra substratelor reprezentate de materiile prima agroalimentare se obțin alimente de înaltă calitate, comparativ cu cele obținute prin procedeele clasice şi cu randamente superioare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul I

CALITATEA ALIMENTULUI

Alimentul analizat dintr-o perspectivă holistică, reprezintă mult mai mult decât ce pare a fi, pentru unii un prilej de desfătare a simţurilor, pentru alţii o necesitate fiziologică, sau ambele, întreţesute cu simboluri şi tradiţii gastro-culturale.

În realitate, alimentul este un principal purtător de informaţie (factor epigenetic) preluată din mediul înconjurător, care interacţionează cu propria noastră informaţie genetică, condiţie absolut necesară bunei funcţionări a entităţii biologice „om".

În fapt omul este un sistem deschis informaţional, cu autoreglare, autoreproducere şi evoluţie antientropică, care prelucrează informaţii exogene (din mediul înconjurător) şi endogene (din propriul mediu intern). Prelucrarea informaţiei în organismul uman are loc pe două căi majore. Prima cale de prelucrare a informaţiei şi cea mai evidentă, este cea realizată în cadrul sistemului nervos (SN – al vieţii de relaţie şi SN – vegetativ) care la om a atins un nivel nemaiîntâlnit la celelalte specii biologice, permiţându-i să conştientizeze propria-i existenţă, fiind dotat cu raţiune şi inteligenţă. A doua cale majoră de prelucrare a informaţiei care se află la baza primei căi şi interacţionează direct cu aceasta, o reprezintă metabolismul celular.

Metabolismul celulelor care alcătuiesc corpul uman, prelucrează în realitate informaţia matricei alimentare, realizând atât integralitatea întregului sistem, dar şi adaptarea acestuia la schimbările mediului înconjurător în care trăieşte. Cu alte cuvinte „suntem ceea ce mâncăm, şi ceea ce au mâncat părinţii şi strămoşii noştri", „trăind şi murind în esenţă la nivel celular", aceste afirmaţii sunt astăzi bine fundamentate de noua ramură a nutriţiei şi geneticii, nutrigenomica, farmacogenomica.

Genomica nutriţională va juca un rol important în managementul maladiilor cronice complexe, management bazat pe interacţiunea nutrient – gene.

La baza evaluării statusului nutriţional al omului, trebuie să stea *fenotipul nutriţional al acestuia*, abordat ca un „set integrat al caracteristicilor genetice, proteomice, metabolomice, funcţionale şi de comportament, la interacţiunea genom – aliment (factor epigenetic), cuantificabil.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezultă că alimentul este un factor esențial al stării de sănătate sau boală și că de calitatea acestuia depinde direct calitatea vieții noastre.

Calitatea alimentului are două componente majore definite prin:

I. Calitatea extrinsecă senzorială, organoleptică, detectabilă prin simțuri furnizează informații prelucrate de SNC: gust, aromă, culoare, textură, palatabilitate și sațietate. Dintre aceşti parametrii doar sațietatea poate fi exprimată pe o scară valorică.

II. Calitatea intrinsecă – biologică – nutrițională – inocuitate: siguranță nedetectabilă prin simțurile noastre, dar obiectivizată prin analize de laborator specifice, putând fi exprimată în indici ai profilului nutrițional și care furnizează spre prelucrare informații metabolismului.

Fără a neglija importanța calității senzoriale a alimentului,în actul socio-cultural al luării mesei, la om, aceasta nu are un răsunet fiziologic asupra sănătății, atât de important, precum se întâmplă în cazul calității nutriționale.

Profilul nutrițional al alimentului: poate fi exprimat prin diferiți indici:

a. *Indice de densitate nutrițională*: exprimat prin conținutul natural – echilibrat în:

- Macronutrienți:
  - → proteine (profil echilibrat în aminoacizi);
  - → lipide (profil echilibrat în acizi grași, saturați, mononesaturați, polinesaturați);
  - → glucide cu eliberare rapidă, eliberare lentă (cu index glicemic – GI și încărcătură glicemică – GL moderate – mici), consum zilnic recomandat sub 40 GL.
- Micronutrienți:
  - → macroelemente (Ca, P, Mg, K, etc.);
  - → microelemente (Se, Zn, Cu, etc.);
  - → vitamine hidro și liposolubile.
- Non-nutrienți fitochemicale:
  - → taninuri;
  - → carotenoizi;
  - → flavonoide;
  - → fitoestrogeni;
  - → glucozinolați.

b. *Indicele de densitate calorică*:

Cantitatea de energie disponibilă, ce poate fi preluată din alimente în urma proceselor de digestie, absorbție, metabolizare, exprimată în Kcal sau Joule.

Alimentele naturale integrale au în general densităţi energetice mici, de 100 – 110 Kcal/100 g aliment.

Calitatea caloriilor este o trăsătură esenţială a acestui indice fiind determinată de nutrientul din care provine: proteine, lipide, glucide.

c. *Indexul glicemic / încărcătura glicemică*:

Indexul glicemic (GI) reprezintă baza fiziologică a ierarhizării alimentelor, în funcţie de efectul lor asupra glicemiei postprandiale, cu implicaţii importante asupra sănătăţii publice.

Indexul glicemic (glicemic index GI) este definit prin aria incrementală a curbei de răspuns glicemic, indusă de o cantitate de 50 g de glucide disponibile, provenind dintr-un aliment testat, exprimată în procente ale răspunsului produs de o cantitate de glucide egal furnizată de un aliment de referinţă / control (glucoza GI = 100), consumată de acelaşi subiect.

În baza indexului glicemic alimentele pot fi clasificate în trei categorii:

- cu index glicemic scăzut: GI ≤ 55;
- cu index glicemic mediu: 55 < GI ≤ 70;
- cu index glicemic ridicat: GI > 70.

Răspunsul glicemic determinat de acelaşi aliment poate varia în decursul unei zile, metoda impunând determinarea indexului glicemic dimineaţa „à jeun". Pe de altă parte un aliment sau dieta zilnică pot conţine mai multe categorii de glucide ceea ce determină o utilitate practică scăzută, acestui indice. Acest neajuns, se corectează, prin calcularea altui indice pe baza primului şi anume încărcătura glicemică (glicemic load GL).

Încărcătura glicemică (GL) ia în consideraţie indexul glicemic al alimentului şi cantitatea de glucide disponibile în porţia de hrană consumată. Nu consumaţi mai mult de 40 GL pe zi.

d. *Scorul antioxidant*:

Exprimă capacitatea antioxidantă a alimentelor şi cu cât este mai ridicată cu atât alimentul este mai sanogen.

Cercetările recente demonstrează faptul că antioxidanţii naturali au efectele benefice maxime, în condiţiile unui stil de viaţă activ sănătos şi în medii nepoluate.

e. *Indexul aterogenic* ($A_tI = HDL - c$: TC):

Indexul aterogenic se defineşte ca raportul între nivelul lipoproteinelor cu înaltă densitate (HDL – colesterol), cu efect cardioprotector („colesterolul bun") şi nivelul colesterolului total seric (TC). Cu cât acest index este mai mare, cu atât scade riscul apariţiei maladiilor cardiovasculare, aterogenezei şi evenimentelor hemoragice sau ischemice (infarct de miocard, accident vascular cerebral – AVC). Unele alimente sau componente

alimentare au un efect semnificativ de creştere a indexului aterogenic (AtI), spre exemplu cazeina din lapte şi mai ales ovomucina din albuşul de ou. În contact cu acestea grăsimile hidrogenate (margarinele) au un index aterogenic foarte mic, fiind deci periculoase, aterogene.

f. *Profil biochimic alcalinizant sau acidifiant.*

g. *Biodisponibilitatea*, reprezintă cantitatea de nutrient sau non-nutrient dintr-un aliment şi viteza de atingere a acestei cantităţi în circulaţia generală şi care poate fi utilizată de organism.

Calitatea biologică ridicată, exprimată prin profilul nutriţional al unui aliment semnifică şi o înaltă calitate informaţională a alimentului, specifică alimentelor naturale integrale.

Alimentaţia şi comportamentul alimentar sunt determinanţi esenţiali a numeroase patologii. Se apreciază că 90% din maladiile coronariene şi peste 30% din cancere pot fi prevenite prin ameliorarea sau schimbarea stilului de viaţă în care alimentaţia joacă un rol primordial. În ciuda eforturilor de educaţie nutriţională, în scopul orientării consumatorului spre o alegere cât mai corectă a alimentelor, prevalenţa maladiilor cronice, diabet de tip II, maladii cardiovasculare, cancere, maladii neurodegenerative, obezitate nu conteneşte a creşte, în ritmuri îngrijorătoare.

Estimările actuale, indică o agravare a situaţiei, care poate determina reducerea speranţei de viaţă a speciei umane, pentru prima dată după câteva secole (Oshansky, 2005) de creştere continuă. Pentru a contracara această tendinţă, autorităţile Uniunii Europene, doresc să susţină acest demers prin introducerea parametrului de calitate a alimentului – profilul nutriţional (Reg. CE 1924/2006 /J. U.E. L404/30 dec.2006).

Profilul nutriţional care defineşte calitatea nutriţională a alimentului va sta la baza „menţiunilor de sănătate" şi/sau nutriţionale, permise a fi înscrise pe eticheta alimentelor. Calitatea nutriţională are o mare complexitate intrinsecă şi oferă fiecărui aliment susceptibilitatea de a se regăsi în cadrul unei alimentaţii echilibrate, însă definirea locului care trebuie ocupat de aliment în dietă, este un demers extrem de delicat şi dificil.

Pe lângă indicii cunoscuţi ai calităţii nutriţionale în stabilirea profilului nutriţional trebuie să se ia în consideraţie şi alte aspecte:

- rolul şi importanţa alimentului (sau categoriei de alimente) şi aportul său în dieta populaţiei în general, sau ţinând cont de câteva grupe de risc, în special copiii;
- compoziţia nutriţională globală a alimentului şi prezenţa în matricea sa alimentară, a nutrienţilor recunoscuţi ştiinţific ca având un efect asupra sănătăţii;

- profilul nutriţional va trebui să permită inovarea de noi produse şi să ţină cont, în acelaşi timp, de obiceiurile şi tradiţiile alimentare, în aşa fel, ca un produs luat individual, să poată juca un rol important în cadrul unei diete alimentare globale.

Principiile de elaborare a unui sistem de profile nutriţionale:

Pot exista trei tipuri de abordare:

- pe categorii de alimente;
- transversală, *sau*
- combinaţia celor două.

Abordarea pe categorii de alimente:

În cadrul acesteia un profil nutriţional este definit pentru fiecare categorie alimentară: lapte şi produse din lapte, pâine, feculente şi cereale, carne, peşte, ouă. Limita acestui sistem rezidă în definirea categoriilor de alimente.

Abordarea transversală:

Se face pe baza unui profil nutriţional unic. Limita sistemului constă în aceea că anumite categorii de alimente, spre exemplu grăsimile vor fi penalizate şi odată cu acestea şi conceptul de alimentaţie variată şi echilibrată.

Alegerea criteriilor nutriţionale:

Principalele criterii nutriţionale studiate în diferite sisteme se referă la nutrienţi şi ingrediente, cunoscute pentru impactul lor cu sănătatea. Se disting criterii nutriţionale având conotaţii pozitive (fibre alimentare, acizi graşi esenţiali omega 3, vitamine, minerale) sau având conotaţii negative (zahăr, sare, grăsimi hidrogenate). Se pot lua în consideraţie şi ingrediente ca fructe, legume, oleaginoase.

Metode de măsurare a calităţii nutriţionale:

Există două sisteme: sistemul bazat pe scoruri şi sistemul bazat pe praguri / limite.

Sistemul scor atribuie o notă globală alimentului pe baza conotaţiilor pozitive şi negative. În sistemul pragurilor pentru fiecare nutrient luat în considerare se definesc clase de conţinut în nutrienţi: bun, intermediar, rău.

Până în prezent au fost elaborate peste 20 de sisteme de caracterizare a profilelor nutriţionale, pe baze ştiinţifice, dar nici unul nu a întrunit toate calităţile cerute de exigenţele legislative şi de aplicare în practică.

Situaţia este şi mai complicată de faptul că până în prezent nu a fost caracterizat un aliment sau alimente etalon – sanogene. Etalonul, referinţa pentru alimentele sănătoase rămâne alimentul natural integral. Dar nici în cazul alimentelor neprocesate, naturale, integrale, nu avem nici o descriere completă a compoziţiei chimice complexe a acestora şi nici studii de

toxicologie adecvate. Mai mult, prin abordarea alimentului din perspectiva informației epigenetice a matricei sale alimentare, cunoștințele sunt și mai limitate. Astfel, spre exemplu, atunci când analizăm riscurile alimentelor provenite din organismele modificate genetic (cartoful modificat genetic Bt), nu avem caracterizată complet contrapartida lui naturală, cartoful nemodificat genetic. La fel se întâmplă și cu celelalte materii prime agroalimentare sau cu alimentele procesate. În cazul alimentelor procesate, compozite, profilele nutriționale sunt complet modificate, și diferite față de profilele nutriționale ale alimentelor naturale integrale. Profilele nutriționale antropizate ale alimentelor procesate „moderne", oferă metabolismului uman (neschimbat de milioane de ani) informație, nutrienți, aditivi, contaminanți cu care acesta nu este obișnuit, producând dezechilibre metabolice puternice (stres metabolic) care se constituie ca factori de declanșare a tabloului patologic alarmant întâlnit astăzi în sănătatea publică și individuală.

Nedispunând de etaloane veritabile pentru calitatea globală a alimentelor este și mai dificil de a recomanda diete sănătoase. Este demonstrat faptul că alimentele consumate separat au o importanță relativă, în raport cu dieta alimentară globală, variată și echilibrată, care reprezintă factorul esențial împreună cu stilul de viață, pentru starea de sănătate.

Dieta globală ancestrală echilibrată și variată uitată sau încă nedescoperită total, alcătuită din alimente naturale integrale, poartă și o amprentă informațională specifică și probabil că aceasta reprezintă referențialul veritabil pentru o alimentație sănătoasă, care să prevină starea de boală. Până când nu vom cunoaște toate acestea într-o abordare holistică, demersurile umanității pentru a elabora alimente și diete sănătoase, nu va avea o fundamentare riguros științifică și nici rezultatele scontate.

1. ALIMENTUL – MATRICEA ALIMENTARĂ

Alimentele reprezintă "*O MATERIE*" de regulă naturală și complexă (MATRICI ALIMENTARE) necesare organismului pentru aportul de substanțe, energie, informație) capabile să întrețină viața și să răspundă în același timp unor exigențe subiective (foame, plăcere), unor obiceiuri, tradiții, posedând și o semnificație simbolică.

Conform definiției date de TREMOLIERES, acestea sunt "*bunuri*" conținând nutrienți, deci hrănitoare, susceptibile de a satisface apetitul, deci apetisante și acceptate ca alimente în comunitatea dată, deci tradiționale.

Manualul de procedură al "*Codex alimentarius*" definește Bunurile alimentare ca fiind toate substanțele procesate, parțial procesate sau

neprocesate, destinate alimentației umane cuprinzând băuturile, guma de mestecat și toate substanțele utilizate în fabricația, prepararea și tratamentul alimentelor, cu excepția substanțelor utilizate exclusiv sub formă de medicamente, cosmetice sau tutun. Această definiție plasează SUPLIMENTELE NUTRITIVE în cadrul alimentelor.

Printre produsele utilizate în fabricarea bunurilor alimentare se disting INGREDIENTELE ALIMENTARE, ADITIVII ALIMENTARI, AUXILIARII TEHNOLOGICI și AROMELE.

Conform reglementării CEE nr. 178/2002 a Parlamentului și Consiliului European prin – ***ALIMENT (PRODUS ALIMENTAR) – se înțelege orice substanță sau produs, procesat integral / parțial sau neprocesat destinat consumului uman sau preconizat a fi destinat consumului uman. În noțiunea de aliment se includ și băuturi, gumă de mestecat și orice altă substanță sau produs, inclusiv APA care este încorporată intenționat în aliment în timpul producerii, pregătirii sau tratării acestuia.*** În noțiunea de aliment **nu se includ** nutrețuri pentru hrana animalelor, animale vii, plante înainte de recoltare, produse medicamentoase, cosmetice, tutun și produse din tutun, substanțe narcotice și psihotrope, reziduuri și contaminanți.

În fapt ALIMENTELE sunt combinații extrem de variate cantitativ și calitativ între următoarele componente:

MACRONUTRIENȚI – carbohidrați cu rol preponderent energetic;
– lipide cu rol structural și energetic;
– proteine cu rol structural și funcțional.

MICRONUTRIENȚI – biocatalizatori cu rol funcțional (vitamine, minerale) *și*

APA ȘI ALTE FLUIDE INDISPENSABILE VIETII,

cuprinse în structuri matrice naturale (provenind din producția vegetală și / sau animală), neprocesate sau procesate. Este deci evidentă natura BIOLOGICĂ a ALIMENTELOR aparținând LANȚURILOR ALIMENTARE (FOOD CHAIN) care pornesc de la sol, apă, aer, producție agricolă, procesare și până la distribuția și impactul acestora cu sănătatea consumatorului.

Matricea ALIMENTARĂ este prin urmare, în esență – O MATRICE BIOLOGICĂ – provenind din celule, țesuturi, organe de natură vegetală, animală, microbiană precum și din alte entități biologice (contaminante, virusuri, prioni) sau substanțe adăugate intenționat în procesul de fabricație (aditivi, adjuvanți s.a.).

MATRICEA ALIMENTARĂ de natura BIOLOGICĂ conține INFORMAȚIE – pe lângă celelalte componente enumerate – INFORMAȚIE GENETICĂ – reprezentată de ADN, ARN, în diferite forme de structurare cromozomi, gene, ribozomi, nucleotide, proteine reglatoare, proteine structurale s.a.

2. ALIMENTUL ŞI INFORMAȚIA ALIMENTULUI
ADN-ul şi GENELE–GENOMICA–TRANSCRIPTOMICA

Toate ENTITĂȚILE VII, existente pe Pământ, sunt organizate şi funcționează pe BAZA UNEI INFORMAȚII, omul însuşi fiind o entitate INFORMATIONAL-ENERGETICO-SUBSTANTIALA, aflată într-un echilibru dinamic. O mare parte din informația vitala, necesara existenței şi sănătății omului, trebuie sa fie furnizată corpului prin alimente. Alimentele denaturate prin prelucrare neadecvata, nu pot fi recunoscute de metabolismul uman, producând dezechilibre care de regula conduc la stări de boala. Recent s-a reconfirmat faptul ca microundele reduc calitatea alimentelor. Comparând conținutul în compuşi antioxidanți, din brocoli, înainte şi după diferite moduri de preparare, s-au constatat următoarele pierderi:

- În vapori de apă 11%;
- În apă fiarta 66%;
- În cuptor cu microunde 97%.

Informația este stocată într-o moleculă INFORMAȚIONALĂ, dublu helicală, autoreplicativă, uriaşă, de ADN (acid dezoxiribonucleic) având o structură monotonă, repetitivă constituită din patru tipuri de subunități, nucleotide, (Adenina A, guanina G, citozina C şi timina T). Transmiterea informației se face codificat prin intermediul unui COD format din 64 de triplete, combinații ale celor 4 nucleotide (fiecare nucleotidă conține o cantitate de informație de 2 BIȚI), luate câte trei, numite CODONI.

CODUL GENETIC ESTE UNIVERSAL în întreaga BIOSFERA.

Informația înscrisă în molecula de ADN (compactată în cromozomi – gene) este TRANSCRISĂ în molecule de ARNm şi apoi TRADUSĂ într-un alt limbaj, în molecule PROTEICE formate din 20 aminoacizi, copierea catenei de ARN mesager fiind realizată cu ajutorul codonilor. Dintre cei 64 codoni, 61 codifică cei 20 aminoacizi iar 3 sunt "semnale stop" marcând

sfârşitul unei informaţii. Deşi astăzi conceptul de GENĂ este considerat superfluu, se admite din raţiuni practice, a fi "UN FRAGMENT de ADN CARE PERMITE REALIZAREA UNEI FUNCŢII MOLECULARE". Expresia unei gene se realizează prin TRANSCRIPŢIE cu ajutorul ARN polimerazei, în COPII ARN premesager.

ADN-silenţios (TRANSPOZONI, PSEUDOGENE, INTRONI)

Genomul uman conţine 3 miliarde de baze, dar numai 40% din acestea sunt organizate ca GENE, restul fiind sub forma de ADN-silenţios (JUNK DNA), care nu codifică aparent nimic. Studii recente au arătat faptul că acest "ADN tăcut" este conservat de milioane de ani, inclusiv la mamifere, ceea ce demonstrează importanţa sa.

PSEUDOGENELE – versiuni "defecte" ale GENELOR NORMALE FUNCŢIONALE se regăsesc şi în genomul uman, fiind evaluate la 30.000. În absenţa PSEUDOGENELOR, genele funcţionale pot deveni nefuncţionale, sugerându-se faptul că reglarea genetică se produce prin interacţiunea CUPLURILOR GENĂ / PSEUDOGENĂ.

INTRONII

Molecula de ADN înainte de a fi TRANSCRISĂ se prezintă sub forma UNUI MOZAIC în care secvenţele CODANTE – EXONII, alternează cu secvenţe NON CODANTE – INTRONII. În final ARN-m nu conţine decât EXONII, INTRONII fiind eliminaţi prin excizare (SPLICING). Dacă însă în procesul de excizie unul sau mai mulţi INTRONI nu sunt eliminaţi devine posibilă sinteza mai multor proteine pornind de la aceeaşi genă.

TRANSPOZONII

O altă categorie de "ADN silenţios" este reprezentată de TRANSPOZONI sau GENE SĂRITOARE. Micile secvenţe de ADN TRANSPOZONIC, non codante, au particularitatea de a "sări" dintr-un loc în altul al genomului şi deci alterează funcţionarea unei gene.

Aceste fenomene pot contribui la explicarea faptului că deşi omul are mai puţine gene decât o plantă de tutun, sau că numai 1,3 % din genom ne deosebeşte de cimpanzei, totuşi omul este atât de diferit de restul fiinţelor vii.

Deşi două organisme pot conţine aceeaşi cantitate de informaţie genetică (gene) în genomul lor, ele pot fi fenotipic foarte diferite.

MITOCONDRIILE (ADNmt)

Sunt bacterii ancestrale simbionte, devenite CENTRALE ENERGETICE celulare. Ele posedă un ADN propriu de tip bacterian moştenit exclusiv pe cale maternă. S-a demonstrat că există **bucle de reglare** între ADN-mitocondrial şi ADN-nuclear indispensabile în buna dezvoltare a celulei. De asemenea ADN-mitocondrial joacă un rol în:

- procesele de îmbătrânire dar şi în
- procesele cognitive.

2.1. PROTEOMICA

În procesul de TRANSCRIPȚIE, prin care ia naştere ARN-premesager acesta poartă secvenţele UTILE – EXONII – precum şi secvenţele "INUTILE INTRONII". Înainte de a fi tradus în PROTEINE ARN-premesager suferă un proces de EXCIZIE (SPLICING) prin care INTRONII sunt detaşaţi de ARN-premesager şi eliminaţi, rezultând astfel un ARN-mesager drastic "REARANJAT". Dar sunt cazuri în care unul sau mai mulţi INTRONI nu sunt excizaţi, regăsindu-se în mare parte, în SINTEZA PROTEICĂ.

Paradoxal ACESTE SECVENȚE NONCODANTE (INTRONII) DEVIN UNEORI CODANTE. "Rearanjarea" ARN-m prin SPLICING şi participarea secvenţelor necodante la procesul de sinteză proteică, conferă o IMPORTANȚĂ MAJORĂ INTRONILOR, deoarece graţie acestor procese este posibil ca pornind de la ACEEAŞI GENĂ (O ACEEAŞI SECVENȚĂ DE ADN) să se genereze mai multe secvenţe de ARN-m şi deci mai multe PROTEINE DIFERITE.

HISTONELE

O calitate primordială a moleculei de ADN este aceea de a se plia în structuri pachet superdense, în jurul proteinelor HISTONICE formând CROMATINA (NUCLEOZOMI). Histonele reglează **expresia genică** prin MODIFICĂRI EPIGENETICE indicând ceea ce trebuie tradus şi ceea ce nu trebuie tradus din molecule de ADN, în funcţie de starea în care se află aceşti FACTORI DE TRANSCRIPȚIE:

– metilat – secvenţă NON TRANSCRISĂ (HETEROCROMATINA);
– acetilat – secvenţă TRANSCRISĂ (EUCROMATINA);
– fosforilat.

În acest mod histonele joacă un rol esenţial, de tip EPIGENETIC (ereditate necodificată de gene) în sinteza PROTEINELOR, fiind reglate îndeosebi de coenzima **S-adenosil metionina** care se acumulează în cazul unui **aport alimentar** crescut de acid folic (vitamina B_4).

Cercetări recente au demonstrat faptul că fiinţele îşi pot adapta genomul pentru a rezista unor agresiuni provenite din mediul înconjurător. Spre exemplu PINII care au supravieţuit CONTAMINĂRII RADIO-

ACTIVE în urma accidentului nuclear de la Cernobâl, şi-au „blindat ADN-ul" sporindu-şi GRUPĂRILE METILATE, pentru a-şi proteja Genele esenţiale. Plantele tinere de pin, crescute pe un teren puternic contaminat radioactiv, timp de zece ani, aveau un nivel de Metilare al ADN-ului cu 30% superior celui normal.

ARN – INTERFERENT

În 1990 (R. Jörgensen) a pus în evidenţă ARN-interferent, un fel de răscruce de căi metabolice, având o structură asemănătoare ARN-mesager, dar **formă dublu catenară** ca a moleculei de ADN. ARN-interferent este un puternic FACTOR DE SILENŢIERE a exprimării genice.

Interferenţa ARN este un fenomen natural şi ubiquitar, fiind prezent la toate organismele superioare. Împreună cu SIRC (Complexul proteic de silenţiere a ARNm) poate distruge GENELE INDEZIRABILE ca:

- gene mutante ale cancerelor;
- gene virale, infectante ale celulei,

reprezentând o "armă chirurgicală celulară puternică". Acest proces natural poate avea în viitor numeroase aplicaţii terapeutice, datorită caracterului său de **"minisistem imunitar celular"** împiedicând PRODUCEREA ACCIDENTALĂ de GENE INDEZIRABILE şi deci SINTEZA PROTEICĂ PATOGENĂ – şi poate o alternativă la terapia GENICĂ.

PROTEINELE ÎNSOTITOARE (SAPERON)

Proteinele ŞAPERON (descoperite în 1989 de P. Golonbinoff) acompaniază şi conferă proteinelor brute nou sintetizate **forma spaţială tridimensională activă**, evitând disfuncţiile provocate de agregarea acestora, datorate fracţiilor hidrofobe. Proteinele nou sintetizate sunt adesea **enzime** a căror funcţionare este împiedicată de agregare şi de conformaţii spaţiale greşite. De asemenea pot avea loc disfuncţii ale proteinelor MEMBRANARE, deosebit de periculoase mai ales în cazul NEURONILOR, datorită perturbării activităţii electrochimice a acestora.

Proteinele ŞAPERON detectează proteinele GREŞIT PLIATE, se fixează de acestea, le depliază, după care se desprind şi urmează REPLIEREA SPONTANĂ CORECTĂ.

Proteinele ŞAPERON sunt molecule foarte vechi şi foarte bine conservate (ele au apărut încă la ARHEOBACTERII), fiind la fel de INDISPENSABILE ca GENELE în procesul de fabricare al proteinelor. Sunt cunoscute 5 mari familii de PROTEINE ŞAPERON. În lumea vegetală este cunoscută proteina ŞAPERON GROEL care corectează erorile de pliere

ale unei enzime esențiale pentru fotosinteză, iar la mamifere HSP 70 (Heat Shock Proteine 70 Kd).

Proteina șocului termic (HSP 70) se află în **centrul rețelei** noastre de CELULE ȘAPERON acționând ca un **"sistem imunitar intracelular"** dirijând proteinele malformate sau excedentare către PROTEOZOMI, unde sunt reciclate peptidele.

Descoperirea proteinelor ȘAPERON a coincis cu descoperirea PRIONILOR, sugerându-se faptul că aceştia nu ar fi decât nişte PROTEINE ȘAPERON "DEGENERATE", capabile de a deplia "OMOLOGII" lor NORMALI, dar într-un sens rău, devenind infecțioase şi transmisibile (BSE, boala vacii nebune).

O. Chernoff afirmă că pe lângă mutațiile suferite de ADN, există MUTAȚII PROTEICE cauzate de ȘAPERONI PRIONICI ca răspuns direct al celulelor la un STRES DE MEDIU.

Cercetări recente ale unor echipe de neurologi canadieni au demonstrat faptul ca în mod normal prionii sunt sintetizați de neuroni şi dirijați apoi spre suprafața acestora, protejându-i împotriva stresului oxidativ. În cazul în care prionii sunt greşit conformați aceştia sunt degradați în compartimentul citosolic celular.

Deşi cu o conformație imperfecta prionii citosolici asigură o **NEUROPROTECȚIE** mai puțin eficienta. Absența totală a prionilor, insa, lasă neuronii fără nici o protecție în față stresului oxidativ. Pe de alta parte cercetători din SUA au emis o ipoteza conform căreia proteinele prionice sunt implicate în procesele memoriei, cum este CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding protein). Aceste cercetări sugerează faptul ca prionii sunt esențiali proceselor vitale fundamentale.

Proteinele SAPERON sunt un indicator al **nediferențierii celulelor.** Prin urmare cu cât o celulă este mai tânără, mai nediferențiată conține mai multe proteine ȘAPERON culminând cu celulele canceroase care conțin o cantitate enormă de ȘAPERONI. Câteva medicamente anticanceroase sunt INHIBITORI DE ȘAPERONI.

2.2. METABOLOMICA

După cum este demonstrat alimentul şi alimentația au un efect major asupra organismului, putând modifica ciclul de viață al acestuia.

Alimentația influențează METABOLISMUL, înțelegând prin acesta **toate procesele biochimice care se desfăşoară într-o celulă sau într-un organism.** Metabolismul cuprinde procese prin care se construiesc molecule

complexe – **căile anabolice** – pornind de la precursori simpli, consumând energie precum şi procese prin care se degradează molecule complexe cu eliberare de energie – **căile catabolice**. Metabolismul este AMFIBOLIC deoarece căile anabolice sunt cuplate cu cele catabolice. Metabolismul poate fi de tip aerob necesitând oxigen sau anaerob.

Cea mai mare parte a METABOLISMULUI ENERGETIC constă în procese de reducere cuplate cu procese de oxidare, reacţii REDOX.

Procesele de OXIDOREDUCERE implică molecule donoare de electroni care se oxidează şi molecule acceptoare de electroni care trec în starea redusă. În organismele superioare cum este omul, celulele de tip eucariot conţin organite cu rol energetic, **mitocondriile**. În interiorul mitocondriilor au loc oxidări aerobe ale substratului NUTRITIV şi transformarea energiei degajate într-o formă utilizabilă de către celule, molecul de ATP (acid adenozintrifosforic).

ALIMENTAŢIA şi efectele sale METABOLICE influenţează profund evoluţia şi starea de sănătate a organismului, prin mecanisme complexe de legătură mediată prin SEMNALE între ACTIVITATEA GENETICĂ şi METABOLISM.

METABOLISM ŞI EREDITATE

Biologia modernă a demonstrat faptul că EXPRESIA GENICĂ, deci şi concentraţiile MORFOGENELOR sunt influenţate de STATUSUL METABOLIC. Apariţia celulei EUCARIOTE şi a fiinţelor PLURICELULARE a fost posibilă datorită existenţei unui SEMNAL METABOLIC. Studiile asupra SEMNALIZĂRII METABOLICE şi REDOX sunt parte integrantă a BIOMEDICINEI. MITOCONDRIILE sunt considerate ca INTEGRATORI DE INFORMAŢII ÎNTRE:

- aportul de NUTRIENŢI;
- cerinţele METABOLICE;
- STRESUL OXIDATIV,

şi ALTE SEMNALE din interiorul CELULEI care pot afecta STAREA DE OXIDARE a TRANSPORTULUI DE ELECTRONI MITOCONDRIALI determinând

*O PRODUCŢIE MAI MARE SAU MAI MICĂ de **OXIGEN REACTIV**.*

Numeroase maladii umane ca:

- Diabetul;
- Cancere;

- Neurologice, neurodegenerative sunt induse de STRESUL OXIDATIV.

DIABETUL

În diabet se înregistrează DEREGLĂRI ale REACȚIILOR REDOX în general şi a RADICALILOR LIBERI (OXIGEN REACTIV, SINGLET) în particular.

În cazul DIABETULUI factorii de MEDIU şi FIZIOLOGICI determină nivele ridicate ale concentrației de glucoză. Abundența acestui nutrient frânează reacțiile REDOX de transport a electronilor mitocondriali şi sporeşte generarea de OXIGEN REACTIV. Acest **radical liber destructiv**, provoacă diferitele efecte patologice ale diabetului.

MALADII NEURODEGENERATIVE ŞI NEUROLOGICE

Cercetările recente au demonstrat faptul că genomul neuronilor umani conține 91 de gene a **căror activitate** diferă față de cea a neuronilor celorlalte primate. Aceste gene care ne diferențiază de primate, determină un METABOLISM FOARTE RIDICAT al NEURONILOR UMANI, fiind responsabile de CAPACITĂȚILE NOASTRE COGNITIVE şi de VORBIRE.

"SUPRAÎNCĂLZIREA" neobişnuită a creierului uman poate explica, în acelaşi timp şi VULNERABILITATEA NOASTRĂ LA MALADIILE NEURODEGENERATIVE generate de STRESUL OXIDATIV, ca urmare a acestui metabolism ridicat (consumul de oxigen al creierului fiind de 35 ml/min/kg).

Structurile nervoase sunt deosebit de vulnerabile la acțiunea AGRESIVĂ a RADICALILOR LIBERI, fiind bogate în ACIZI GRAŞI POLINESATURAȚI, sensibili la PEROXIDARE.

Țesutul nervos şi creierul conțin **"SURSE FIZIOLOGICE" – ENDOGENE – generatoare** de STRES OXIDATIV (radicali liberi) ca:

- metabolismul aminoacizilor excitatori (GLUTAMAȚII, ASPARTAȚII care în exces devin EXCITOTOXINE – neurotoxice);
- metabolismul neurotransmițătorilor şi compuşilor endogeni:
  - dopamina;
  - adrenalina şi noradrenalina;
  - serotonina;
  - acidul guanidino-glutaric.

BCU IAŞI - CENTRU UNIVERSITAR - LIBRARY

- modificări microvasculare (datorate îmbătrânirii sau diabetului);
- macrofage, microglii,

sau **surse EXOGENE**:

- ioni metalici, metaloproteine, neurotoxine.

Aceste surse de RADICALI LIBERI induc "SUFERINȚA SISTEMELOR ENZIMATICE ANTIOXIDANTE" amplificând cercul vicios al AGRESIUNII OXIDATIVE.

CANCERELE

Cancerul este rezultatul unei **"proliferări celulare incontrolabilă"**, recunoscându-se în mod cert strânsa relație între OBICEIURILE NUTRIȚIONALE, STILUL DE VIAȚĂ și apariția NEOPLAZIILOR (80 % din cancere sunt generate de condițiile de viață, incidența acestora crescând dramatic în ERA INDUSTRIALĂ).

Se acceptă faptul că două din trei decese datorate cancerului POT FI EVITATE prin corectarea STILULUI DE VIAȚĂ ȘI AL CELUI NUTRIȚIONAL.

Organismul uman este alcătuit din cca. 60.000 de miliarde de celule, și pentru a se putea menține în viață, păstrându-și forma și funcțiile, este necesar ca în fiecare moment, (tournoverul celular) numărul celulelor care se nasc să compenseze cât mai exact numărul celulelor care mor. Mecanismele complexe de reglare veghează ca fiecare celulă dispărută să fie înlocuită cu o nouă celulă, având aceeași funcție și aceeași poziție (celulele normale, diferențiate se divid de un număr finit de ori, pe când cele maligne, devin celule nediferențiate, care se divid indefinit formând clone).

Celula canceroasă este definită de trei caracteristici:

- **nemurirea** – capacitate indefinită de proliferare;
- **autonomia diviziunii celulare** – pierderea capacității de relaționare, de recunoaștere a semnalelor, (reprezentate de factori de creștere, inhibitori, citokinetice, chimiokinetice) primite de la alte celule vecine sau de la mare distanță (teoria AUTOCRINĂ);
- **infiltrația – migrația** – celula neoplazică nu are nevoie de mesaje pentru a se multiplica putându-se infiltra în țesuturile vecine și migrează la distanță formând metastaze.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Distrugerile cauzate ADN-ului de AGENȚII GENOTOXICI:

- **radicalii liberi eliberați în metabolismul energetic;**
- **radiații UV, radiații ionizante;**
- **carcinogeni chimici şi biologici exogeni,**

trebuie "reparate" înainte de începerea DIVIZIUNII CELULARE, altfel leziunea este fixată şi transmisă celulelor fiice.

Un sistem special de securitate, APOPTOZA (moartea la comandă) ucide, înainte de diviziune celulele în care ADN-UL nu a fost reparat.

Când însă leziunea ADN-ului a fost **"reparată cu erori"**, iar acestea **nu au fost detectate de sistemele enzimatice intracelulare, rezultă o MUTAȚIE.** Astfel ADN-ul celulei şi al descendenților ei diferă de ADN-ul normal, putând fi **punctul de plecare al unei cancerogeneze.**

Recent cercetările au fost concentrate asupra MITOCONDRIILOR şi implicațiilor acestora în cancerogeneză, datorită demonstrării rolului lor în APOPTOZĂ şi alte aspecte ale BIOLOGIEI TUMORALE.

GENOMUL MITOCONDRIAL este în mod particular SENSIBIL la MUTAȚII, deoarece ÎNALTA CONCENTRAȚIE A SPECIILOR DE OXIGEN REACTIV (radicali liberi) generată în aceste organite (centrale energetice celulare) este răspunzătoare de EFICACITATEA SCĂZUTĂ a REPARĂRII ADN-ului.

DISFUNCȚIA MITOCONDRIALĂ este una dintre cele mai profunde caracteristici ale TUTUROR CELULELOR MALIGNE.

MUTAȚIILE ADN-ului MITOCONDRIAL (punctuale, deleții şi duplicații) au fost detectate într-o serie de cancere: **tiroidian, ovarian, rinichi, glandele salivare, ficat, gastric, plămân, creier, colon, vezică, gât, sân şi leucemie.**

Datorită naturii CLONALE a celulelor canceroase, tumorile conțin integral MUTANTE HOMOPLASMICE cu ADN – MITOCONDRIAL. Incidența ADN-mitocondrial mutant în celulele canceroase este extrem de ridicată față de incidența ADN-ului nuclear mutant. Acestea sugerează faptul că ADN-ul mitocondrial poate fi un interesant BIOMARKER pentru detectarea multor cancere.

AVÂND ÎN VEDERE ROLUL MITOCONDRIEI ÎN:

- METABOLISMUL ATP, generator de RADICALI LIBERI şi în
- REGLAREA APOPTOZEI,

MUTAȚIILE ADN-ului mitocondrial afectează capacitățile energetice ale celulei, sporind STRESUL OXIDATIV şi distrugerile provocate ADN-ului

NUCLEAR. Cercetări recente au demonstrat faptul că ADMINISTRAREA DE ANTIOXIDANȚI a determinat REVERSIA FENOTIPULUI CELULAR MALIGN, prin INHIBAREA PROLIFERĂRII şi STIMULAREA APOPTOZEI.

Pe de altă parte OXIGENUL REACTIV este o **"MOLECULĂ SEMNAL"** EFICACE, interacționând direct cu produşii primari ai GENELOR – PEPTIDELE şi PROTEINELE.

Spre exemplu PROTEINELE CU ACTIVITATE ENZIMATICĂ, deseori conțin în CENTRUL ACTIV, perechi de aminoacizi ca cisteina, cistina, metionina care pot exista fie în STARE REDUSĂ – tiolică, fie în STARE OXIDATĂ (legați prin punți disulfhidrice).

Oxigenul reactiv OXIDEAZĂ CENTRUL ACTIV AL ENZIMEI – ALTERÂNDU-L sever, cu efecte asupra activității enzimatice, fie în sensul creşterii acesteia sau inhibării ei.

Aceste fenomene joacă un rol esențial şi în EXPRESIA GENICĂ prin MECANISME EPIGENETICE influențând forțele de interacțiune între PROTEINELE HISTONICE, REGLÂND astfel FRECVENȚA ASOCIERII / DISOCIERII DE NUCLEOZOMI determinând PROBABILITATEA CA GENELE SĂ FIE TRANSCRISE sau NU (acetilare, metilare, fosforilare).

Când o Celulă exprimă o genă sau un grup de gene care îi permit un răspuns mai adecvat la mediul său, producând spre exemplu un RECEPTOR prin care detectează o MOLECULĂ HORMONALĂ schimbarea metabolică indusă determină STABILIZAREA STATUSULUI ACTIV AL GENEI.

Ca urmare activitatea ENZIMELOR care catalizează modificările HISTONELOR depinde de concentrația MOLECULELOR CHEIE ale METABOLISMULUI:

- Acetil coenzima A (Acetil – CoA);
- Nicotin adenindinucleotid (NAD);
- Acidul Adenozin trifosforic (ATP).

STATUSUL METABOLIC AL CELULEI poate influența EXPRESIA GENICĂ favorizând fie STABILIZAREA fie MODIFICAREA SA.

Celula utilizează FLUCTUAȚIILE MOLECULARE ALEATORII în scopul amplificării repertoarului de GENE care se EXPRIMĂ. Dacă o nouă combinație devine favorabilă pentru celulă ea se va STABILIZA deoarece permite celulei de a-şi RESTABILI ECHILIBRUL METABOLIC.

Cercetările moderne demonstrează faptul că viața utilizează mecanismele GENETICE **deterministe** (asemănător unor directive) dar în acelaşi timp viața este supusă şi influenței **fenomenelor aleatorii** care devin factori

de **modulare a fenotipului,** receptând semnale ENDOGENE şi EXOGENE, stabilindu-se un **dialog între factorii genetici şi epigenetici,** demonstrând SUPLEŢEA şi ADAPTABILITATEA PROGRAMULUI GENETIC.

ADN-ul nu este singura moleculă purtătoare de INFORMAŢIE.

PROTEINELE prezintă aceeaşi proprietate STRUCTURALĂ şi INFORMAŢIONALĂ, având în acelaşi timp şi o extrem de importantă ACTIVITATE ENZIMATICĂ.

Astăzi devine din ce în ce mai clar, faptul că, "NATURA lucrează NELINEAR", iar aplicarea TEORIEI HAOSULUI ÎN BIOLOGIE tinde să demonstreze că fiinţele vii se supun unei DEZORDINI SPECIALE NĂSCĂTOARE DE ORDINE.

Conform teoriei CONSTRUCTALE, FORMA GLOBALA A UNUI BIOSISTEM este determinată "*a priori ca directivă genetică*", fiind supusă în acelaşi timp în decursul creşterii şi evoluţiei lui unor multiple interacţii locale – autoorganizatoare – de optimizare a distribuţiei imperfecţiunilor. Spre exemplu, forma globala a unui os, rezulta din optimizările locale determinate de biosenzorii ce măsoară în permanenţă presiunea exercitată asupra osului, obligând osteoblastele să depună compuşii de calciu în zonele în care presiunea este mai ridicată. Spre deosebire de interpretarea FRACTALĂ-descriptivă -, perspectiva constructală este -predictivă - sugerând că natura nu este fractală ci constructală, evoluând antientropic prin autoorganizare, (A. BEJAN, 2000).

În concluzie ALIMENTUL important FACTOR DE MEDIU şi STILUL DE VIAŢĂ (incluzând şi alimentaţia – cantitatea de carcinogeni introdusă prin alimente, plămâni, piele în organism se află în raport de 10^6 / 10^3 / 1), influenţează puternic EXPRESIA GENICĂ, determinând FENOTIPURI DIFERITE – NORMALE sau PATOLOGICE – ale aceluiaşi GENOM UMAN. De aceea reacţiile fiecăruia dintre noi la alimente, medicamente, boală sunt diferite.

2.3. NUTRIGENOMICA – INFORMAŢIA MATRICEI ALIMENTARE

Privit din perspectiva fizică cuantică, **universul** este un gigantic calculator, care prelucrează informaţii, cu cea mai bună precizie permisă de legile naturale. O **matrice informaţională universală** străbate Universul, iar **materia** nu poate fi separată în nici o circumstanţă de **informaţie.**

Alimentul este constituit din elementele Universului cuantic şi supraatomic şi se supune acestor legităţi, fiind un purtător de **informaţie. Informaţia alimentului**, este de fapt, cea mai profundă şi importanţă caracteristică a **calităţii alimentului** determinând **efectul său nutriţional** şi **valoarea sa biologică.**

Alimentul ca element de mediu este unul dintre cei mai importanţi factori **epigenetici** care racordează fiecare entitate vie la **matricea informaţională universală**, având ca efect atât modularea evoluţiei individuale, dar şi a subsistemelor şi suprasistemelor ei.

Antropizarea puternică a alimentului are ca efect modificarea profundă a **informaţiei vehiculate de acesta**, producând efecte atât asupra individului, dar şi asupra mediului înconjurător.

Universul în care trăim, în viziunea holistică, sistemică apare ca **un întreg armonios şi indivizibil.** El este de fapt o **reţea de relaţii dinamice**, care includ observatorul uman şi **conştiinţa sa** raţională şi intuitivă într-un mod organic, natural.

Lumea materială nu se reduce la entităţi fundamentale (ex.: cărămizi fundamentale de materie) ci ea trebuie percepută integral prin coerenţa cu sine însăşi. Universul este o **reţea dinamică de evenimente interconectate,** în care întregul este împachetat în fiecare dintre părţile sale ca într-o hologramă. Universul nu este însă o hologramă statică ci el conţine o **ordine – informaţie** împachetată la nivel subatomic (ex. domeniul negentropic al electronului) într-o **manieră esenţial dinamică (holodinamică) (1). Bohm** considera că însăşi conştiinţa este o trăsătură esenţială a **holodinamicii** (Bohm 1980 citat în CAPRA). De altfel cercetările moderne demonstrează faptul că legile fizicii pot fi considerate ca instrucţiuni ale unui program de computer, iar universul însuşi ca fiind un imens calculator. Fiecare particulă subatomică (electron, foton, etc.) stochează informaţia sub formă de biţi de date, iar de câte ori două astfel entităţi interacţionează, aceşti biţi sunt transformaţi. Materia, existenţa fizică ($E = mc^2$) şi conţinutul de informaţie al acesteia sunt legate inextricabil (J. Wheeler). **Materia nu poate fi separată de informaţie.** Cu alte cuvinte Universul subatomic (cuantic) şi cel atomic emergent din primul, este organizat de o **matrice informaţională** (ISET – **I**nformaţional, **s**ubstanţial, **e**nergetico, **t**emporală) dinamică. Universul computer calculează. El se calculează pe sine, câmpurile cuantice, substanţele chimice, entităţile vii, inclusiv fiinţele umane, stelele, galaxiile (7). Rezultă că şi toate entităţile vii inclusiv fiinţa umană sunt sisteme deschise, informaţionale cu autoreglare, autoreproducere şi evoluţie anti-entropică, fiind definite de **tipare de organizare** constituite din **matrici ISET**. Un sistem viu este definit de o **configuraţie a relaţiilor** dintre sub-

sistemele lui componente, stocată în matrici ISET, care determină structura materială a sistemului. Procesul continuu, **dinamic** de concretizare a acestor tipare **stocate în matricile ISET** reprezintă chiar **fenomenul vieții.**

Întreg Universul este guvernat de o **matrice informațională**, care îl străbate din adâncurile cuantice până la ultimul termen al lumii supraatomice: molecule, entități vii, galaxii. Toate ființele vii, existente pe Pământ, sunt organizate şi funcționează pe gaza unei **matrici informaționale**. **Omul** însuşi este o **entitate informațional – energetico – substanțială**, aflată într-un echilibru dinamic şi în directă conexiune cu **matricea informațională universală**. Racordarea ființei umane la matricile ISET se realizează la toate nivelele subsistemelor şi suprasistemelor lui prin canale informaționale diverse. Unul dintre cele mai puternice canale de integrare informațională a ființei umane este reprezentată de **aliment**.

3. INFORMAȚIA ALIMENTULUI, FACTOR EPIGENETIC MAJOR

Din punct de vedere ecologic omul se află în vârful piramidei lanțurilor alimentare devenind un integrator al acestora. Omul a evoluat ca ființă biologică şi apoi social – culturală, înzestrată cu conştiință, rațiune, utilizând timp de sute de mii de generații o alimentație extrem de diversificată în contextul stilului său de viață caracteristic, de vânător – culegător.

Alimentele sunt, în fapt, **părți din mediul înconjurător** purtătoare de **informație**, ingerate şi prelucrate prin procesele de digestie absorbție, metabolizare şi apoi integrate în informația entități consumatoare.

Analizând compoziția alimentelor constatăm că acestea sunt celule, țesuturi, organe de origină vegetală sau animală, microorganisme, constituite din macronutrienți, micronutrienți, non-nutrienți, aditivi alimentari, contaminanți în matrici alimentare naturale complexe, minimal procesare sau înalt procesate (Fig. 1 orig.).

Componentele unei matrici alimentare naturale se află înglobate într-o rețea informațional – substanțială care vehiculează **informații** din mediul înconjurător, ca semnale **epigenetice**, strict necesare racordării adecvate a individului în cadrul speciei şi la nivelele superioare ale ecosistemului şi biosferei.

Prin procesare matricea alimentară suferă modificări informaționale cu atât mai profunde cu cât procesarea este mai avansată furnizând totodată maşinăriei informatice a organismului şi nivelul de antropizare al hranei (5).

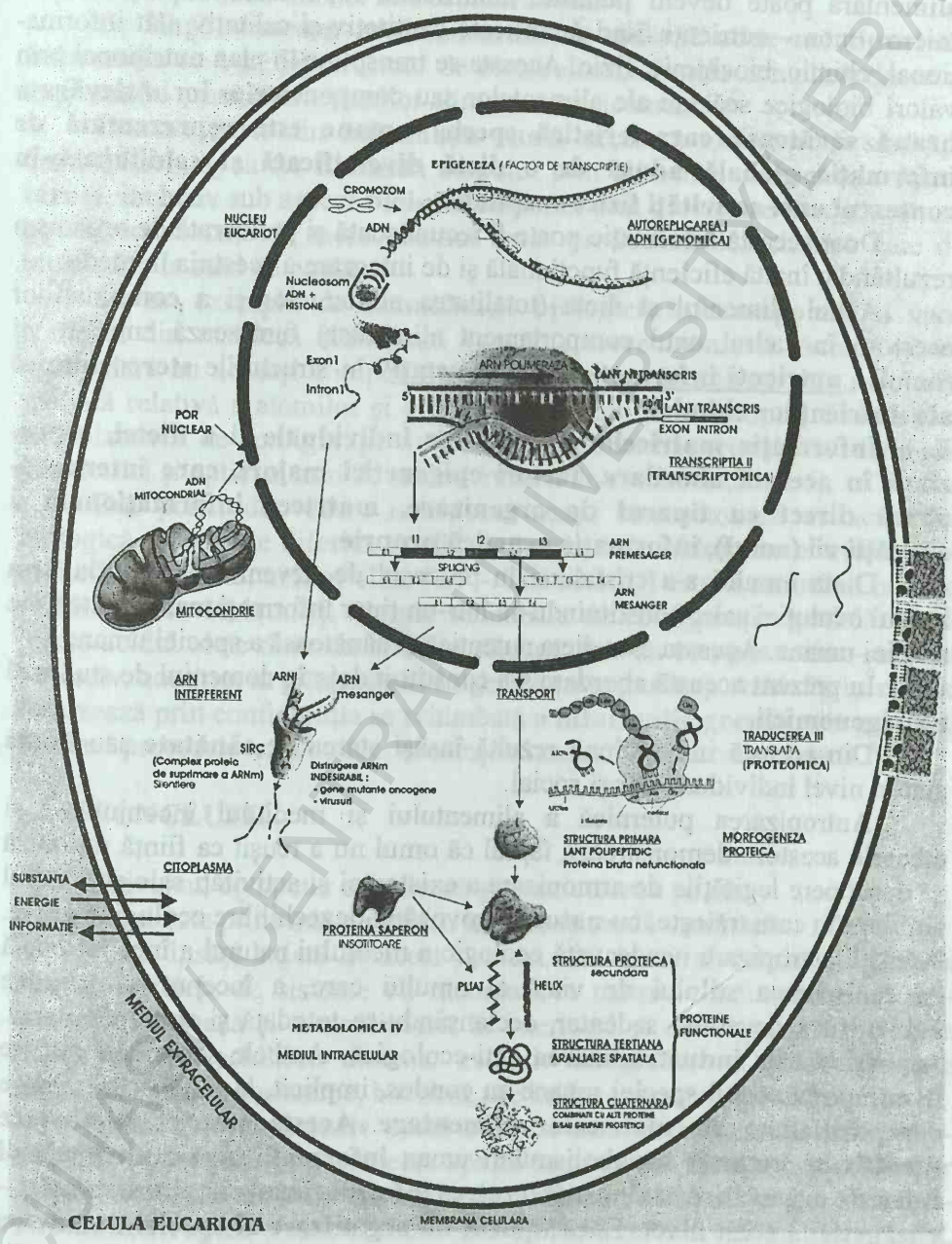

Fig. 1.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Nivelul de antropizare al alimentelor reprezintă un puternic semnal, de regulă, stresant pentru **tiparul** de organizare al entității umane. Matricea alimentară poate deveni puternic modificată, raporturile dintre macro – micro – non – nutrienți fiind modificate cantitativ și calitativ atât informațional, chimic, biochimic, fizic. Aceasta se transpune în plan nutrițional prin valori biologice scăzute ale alimentelor sau componentelor lor. **Adevărata hrană sănătoasă caracteristică speciei umane este reprezentată de informația globală adusă de o dietă diversificată și echilibrată în contextul unei activități fizice susținute.**

Doar această informație poate fi recunoscută și prelucrată de organism rezultând o înaltă eficiență funcțională și de integrare a acestuia în mediu.

Astfel alimentul și dieta (totalitatea alimentelor și a combinațiilor acestora în cadrul unui comportament alimentar) furnizează entității vii (omul) **„nutrienți informaționali incrustați"** în structurile **stereochimice ale nutrienților chimici.**

Informația matricelor alimentelor individuale și a dietei, reprezintă în această abordare, factori epigenetici majori, care interacționează direct cu tiparul de organizare, matricea informațională a entității vii (omul), informația genetică proprie.

Dieta omului s-a cristalizat în procesul de devenire a acestuia de-a lungul evoluției sale, constituindu-se într-un tipar informațional caracteristic speciei umane. Aceasta este dieta autentică și sănătoasă a speciei umane.

În prezent această abordare s-a constituit deja în domeniul de studiu al **nutrigenomicii.**

Din această interacțiune rezultă însăși starea de **sănătate** sau **boală** atât la nivel individual, dar și social.

Antropizarea puternică a alimentului și mediului înconjurător și efectele acestora demonstrează faptul că omul nu a reușit ca ființă rațională să descopere legitățile de armonizare a existenței și activități sale cu mediul ambiant în care trăiește, cu **natura**, provocând dezechilibre ecologice grave. Această antropizare neadecvată ecologic a mediului natural a început odată cu schimbarea stilului de viață al omului care, a început să practice **agricultura** devenind sedentar, declanșându-se totodată și suprapopularea. A continuat cu **industrializarea** anti-ecologică. Ambele schimbări majore în comportamentul speciei umane au condus, implicit, la modificări majore **compoziționale ale matricelor alimentare. Aceste matrici alimentare modificate** transmit metabolismului uman **informații străine propriului tipar de organizare** creând atât un **stres informațional** dar și **substanțial – energetic** la acest nivel. Dacă **tiparul de organizare al speciei umane** va găsi resursele pentru a contracara efectele negative ale alimentelor modificate informațional și care poartă și mesajele suprapopulării și schimbărilor

antropice ale mediului înconjurător (care se comportă şi ca factori frenatori – reglatori ai numărului de indivizi în populaţie), atunci specia umană va supravieţui probabil într-un nou echilibru creat.

Pe lângă alimente, **medicamentele de sinteză aduc noi tipuri de informaţie** ce vor fi prelucrate de metabolism, situaţia complicându-se şi mai mult în urma interacţiunilor aliment – medicament.

O mare parte din **informaţia vitală** necesară existenţei şi sănătăţii omului, trebuie să fie furnizată corpului prin alimente. **Alimentele denaturate**, inclusiv sub aspect **bioinformaţional** prin prelucrare neadecvată, nu pot fi recunoscute de metabolismul uman producând dezechilibre care de regulă duc la stări de boală.

Ca un exemplu de **semnificaţie biologică informaţională** a unor compuşi din matricea alimentară vom cita **stereoizomerii**. Aceste specii moleculare au aceeaşi compoziţie chimică dar se deosebesc prin aranjarea spaţială relativă a atomilor şi grupelor de atomi ce le compun. Există deci stereoizomeri de configuraţie moleculară, cei mai importanţi fiind izomerii geometrici şi optici alături de stereoizomerii de conformaţie (4, 6).

Din punct de vedere nutriţional aceşti stereoizomeri au activitate biologică extrem de diferită. Astfel în procesul de hidrogenare artificială a uleiurilor vegetale, **acidul oleic** [ω9 – CIS 18:1(9)] este transformat în **acid elaidic** [trans 18:1(tr.9)]. Simpla schimbare de configuraţie spaţială transformă acidul oleic dintr-un nutrient sănătos, într-un compus trans – extrem de nociv, conţinut în grăsimile hidrogenate (**margarine**). Acidul gras elaidic furnizează prin configuraţia sa schimbată **o informaţie greşită** care perturbă profund procesele metabolice, declanşând maladii cardiovasculare (CVD).

CONCLUZII

Universul computer calculează şi se calculează pe sine.

Totul este prins într-o matrice **informaţională cuantică**.

Viaţa însăşi există în acest context. De la nivel celular şi până la biosferă reţelele de sisteme vii racordate la matricea informaţională universală calculează şi semnalizează în interiorul şi exteriorul lor. Se tinde astfel spre un echilibru dinamic evolutiv integrativ, ca entităţi discrete (indivizi, specii, ecosisteme, biosferă, mediu înconjurător abiotic).

Entităţile vii inclusiv omul sunt de **natură informaţional – substanţial – energetică** cu existenţa **spaţio-temporală. Hrana** este un **factor epigenetic major** şi joacă un important **rol integrator. Fiinţele, „condensări antientropice"**, sunt entităţi care prelucrează informaţia alimentului, factor de mediu, epigenetic, important în menţinerea funcţionalităţii sistemului şi a integrării sale în structurile superioare.

Rezultă că una din **calitățile esențiale ale alimentului** este reprezentată de **calitatea informației** furnizate de acesta sistemului viu consumator. Mai mult pentru că dieta este mai importantă decât fiecare aliment luat separat, rezultă că rețeaua informațională a dietei are semnificația biologică cea mai profundă pentru sănătatea individului și a speciei sale.

O nouă știință se naște din biologia moleculară revoluționând disciplina nutriției umane. **Nutrigenomica** studiază rolul nutrienților în modularea expresiei genelor codante ale proteinelor, metabolismelor, diferențierii celulare și creșterii celulare (2).

Pe această bază s-au creat instrumente performante, precum testele de ADN sau **tehnologia „*Chip-ului Genetic*"** care permite urmărirea efectelor **nutrienților** sau **aditivilor alimentari** asupra **exprimării genelor** în celule, țesuturi, organe, organisme. Prin studierea efectelor nutrienților și aditivilor la nivel molecular se poate evalua efectul acestora asupra căilor biochimice esențiale, răspunsului imun și consumului energetic (3).

Mijloacele nutrigenomicii permit cuantificarea efectelor unui singur nutrient cheie, spre exemplu, un microelement în matrici organice, asupra **profilurilor** de **exprimare** a **miilor** de **gene**.

Alimentele conțin **regulatori dieto-derivați** ai **expresiei genice** care pot fi:

- nutrienți (ex. acizi grași, seleniu, zinc);
- non-nutrienți (ex. fitochimicale, izoflavone);
- metaboliți ai componenților alimentari (ex. eicosanoide, ac. retinoic);
- compuși rezultați în urma procesării alimentelor (ex. amine heterociclice);
- produși finali ai metabolismului bacterian intestinal (ex. acizi grași cu lanț scurt).

Controlul expresiei genice poate fi realizat de către un singur nutrient component al alimentelor, dar de regulă acest control este complex, exercitându-se prin interconexiunile dintre nutrienți (ex. retinoizi și acizi grași) sau nutrienți și hormoni (hormonul tiroidian și acizi grași).

3.1. INTERACȚIUNILE GENE – DIETĂ

Componenții nutrienți și non-nutrienți din alimente, interacționează cu genele, influențând concentrația și funcțiunile proteinelor celulare prin reglarea **expresiei genice** la diferite nivele: transcripția genică, stabilitatea ARN_m, translația și post-translația ARN_m.

Concentrația proteinelor sintetizate în sistemele celulare este determinată de rata cu care sunt realizate copiile de ARN_m, în procesul de transcriere.

Această rată de sinteză este condiționată de legarea **factorilor** de **transcripție** la secvența de recunoaștere specifică a ADN-ului, aflată la capătul 5' al genelor.

3.2. FACTORII DE TRANSCRIPȚIE GENICĂ

Un exemplu de **reglare – nutrient** a **concentrației factorilor** de **transcripție** poate fi mecanismul de reglare al **lipidelor**:

- pentru colesterol este **regulator – sterol elementul** de **cuplare** al **proteinei-2** (SREBP-2);
- pentru acizii grași polinesaturați (PUFA) **regulator** – elementul de **cuplare** al **proteinei-1** (SREBP-1).

Precursorul inactiv al moleculelor reglatoare SREBP este localizat în membrana celulară și în reticulul endoplasmic. Forma activă a moleculei reglatoare este eliberată în două stadii de scindare a moleculei precursoare.

Eliberarea moleculei mature de SREBP este înalt dependentă de concentrația colesterolului și probabil de compoziția în acizi grași a reticulului endoplasmic. Când nivelul de colesterol sau PUFA din reticulul endoplasmic este ridicat, eliberarea factorului de transcripție SREBP este nesemnificativă. În cazul, în care, concentrațiile de colesterol sau PUFA sunt scăzute, rata de eliberare a factorului de transcripție matur SREBP crește.

Modificările în eliberarea factorului de transcripție SREBP sunt strâns corelate cu modificările ratei de transcripție a **genelor colesterogenice** și **lipogenice**.

Constituenții alimentari exercită astfel, o puternică influență asupra **afinității factorilor de transcripție** pentru **secvențele** de **recunoaștere** specifică a ADN-ului. Factorii **lipofili** și **metaboliții** lor modulează activitatea **factorului** de **transcripție ADN-cuplare**.

3.3. RECEPTORII CELULARI

Receptorii joacă un rol esențial în semnalizarea chimică inter– și intracelulară. Legarea unui neurotransmițător, hormon, medicament, nutrient, mesager intracelular de receptor influențează una sau mai multe funcții celulare, spre exemplu, transcripția genică sau permeabilitatea membranei.

Receptorii sunt localizaţi în:

- membrana plasmatică – pentru neurotransmiţători, citokine, hormonii circulanţi;
- organele nemembranare – pentru transducţia Ca^{2+};
- citosol – acţionând ca **factori de transcripţie ligand dependenţi** migrând în nucleu după fixarea de ligand. Liganzii acestui tip de receptori pot fi steroizi sau alţi hormoni liposolubili.

Agoniştii sunt **liganzi** cuplaţi la **receptori** care devin activi exprimând un **răspuns biologic**, iar **invers antagoniştii** reduc exprimarea răspunsului biologic. **Antagoniştii** sunt medicamente care reduc acţiunea altor medicamente, care sunt deseori agonişti.

Regiunea macromoleculei **receptor** care leagă agonistul endogen reprezintă **centrul de recunoaştere al receptorului**.

Receptorii pot fi clasificaţi în patru clase structurale:

- receptori ion-tunel (ION-CHANNEL);
- receptori cuplaţi G-protein ($GPCR_S$- G-protein complex receptors) cu şapte domenii transmembranare;
- receptori asociaţi enzimelor (Enzyme-associated receptors);
- receptori reglatori ai transcripţiei genice.

Receptorii sunt implicaţi în **reglarea tuturor funcţiilor biologice**, iar exprimarea lor calitativă şi cantitativă este rezultatul interacţiunilor dintre **factorii genetici şi epigenetici**. Alimentele sunt unii dintre cei mai puternici **factori epigenetici**, ele fiind părţi de **mediu înconjurător**, care vehiculează **informaţii esenţiale**, pentru integrarea **entităţilor vii** (inclusiv **omul**) în ecosisteme şi Biosferă. De aceea **alimentele** determină **starea de sănătate** sau boală, de echilibru dinamic (antientropic) sau dezechilibru şi evoluţie entropică a **entităţilor vii** (moarte).

În prezent se desfăşoară cercetări intense pentru a descoperi potenţiali nutrienţi sau non-nutrienţi din alimente, care interacţionează cu receptorii celulari relevanţi şi pot îmbunătăţi starea de sănătate şi confort al consumatorilor. O direcţie importantă de cercetare este reprezentată de studiul receptorilor $GPCR_S$ deoarece aceştia sunt capabili de a comunica cu „**lumea exterioară**" fiind implicaţi în procesele de vedere, miros, gust, aromă, auz, alte simţuri. Numeroase secvenţe de ADN sunt reglate de GENOME – $GPCR_S$ care se pot cupla cu liganzi naturali. Acestea sunt denumite orphan$GPCR_S$. Malfuncţiile receptorilor $GPCR_S$ sunt cauza unui număr enorm de boli şi se speră descoperirea unor alimente sau medicamente care să corecteze aceste disfuncţii, vindecând maladiile determinate de aceştia.

Astăzi este descrisă o familie largă de **receptori celulari steroid-dependenți,** incluzând:

- receptorii retinoizi – receptorul pentru vitamina D_3;
- receptorii de activare peroxizom – proliferator ($PPAR_s$).

Acești receptori joacă un rol esențial ca **regulatori** ai **genelor** implicate în: **diferențierea celulară, metabolismul energetic și al lipidelor, răspunsul inflamator, formarea plăcii aterosclerotice, cancer.**

Activarea factorului PPAR este determinată de: acizii grași omega-3 și omega-6, acizii linoleici conjugați (CLA), prostaglandine, leukotriene, acizi grași oxidați.

Fosforilarea și **defosforilarea** proteinelor este reglată de activitatea **protein-kinazelor specifice** și **fosfatazelor,** care sunt de asemenea modulatori ai **activității ADN**^{ului} pentru numeroși **factori de transcripție.**

Mai mult acționând direct asupra kinazelor sau fosfatazelor **factorii alimentari** pot influența activitatea de cuplare a ADN^{ului}, afectând **statusul redox** al celulelor. Antioxidanți ca vitamina E, pot proteja celula împotriva **stresului oxidativ,** prevenind inițierea stresului generat de **calea kinazei.** Pe de altă parte antioxidanți ca **glutationul** pot crește activitatea de cuplare a ADN^{ului} pentru factorii de transcripție, protejând statusul lor **oxidativ.**

Unii nutrienți sunt implicați în reglarea mișcării ARN_m în citosol, iar glucoza și $PUFA_S$ modulează mecanismele de procesare a ARN_m (8).

4. ALIMENTAȚIA ȘI STABILITATEA ARN_m

Cantitatea și stabilitatea ARN_m transcris, depinde de **SEMNALELE CITOSOLICE.**

Exemple de reglare prin dietă a cantității și stabilității ARN_m transcris sunt:

- stabilizarea ARN_m – sintetazei acizilor grași de către glucoză;
- stabilizarea glutation peroxidazei de către seleniu (Se);
- destabilizarea ARN_m – transferin receptorului de către fier (Fe). Când concentrația celulară a fierului este scăzută, **PROTEINELE REGULATOARE** cuplează fierul și sporesc stabilitatea de transcripție. Invers, cuplarea fierului accelerează degradarea **TRANSFERIN RECEPTORULUI** ARN_m.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.1. ALIMENTAȚIA ȘI BIOSINTEZA PROTEINELOR PRIN TRANSLATIA ARN_m

Proteinele specifice organismului sunt biosintetizate pornind de la matrița de ARN_m care necesită legarea de ribozomi pentru ca apoi să-i poată fi citit mesajul bioinformatic (Fig. 1, 2). Factorii alimentari modulează acest proces, spre exemplu, blocând legarea ARN_m de ribozomi, modificând afinitatea pentru situl de inițiere sau rata de elongație a peptidei. Lipsa aminoacizilor este de asemenea un factor cheie de reducere sau stopare a elongației peptidelor. Un exemplu de astfel de factor alimentar (nutritiv) este **statusul Fierului** care poate **inhibă translația feritinei**. Dieta joacă un rol important în procesul de translație al ARN_m implicat în biosinteza proteinelor, inclusiv a celor enzimatice, cum sunt kinazele, fosfatazele și proteinele ribozomale (Tabel 1).

Tabel 1

CONSTITUIENȚI ALIMENTARI CU ROL ÎN REGLAREA CĂILOR DE EXPRESIE GENETICĂ A PROTEINELAOR

ACȚIUNE SPECIFICĂ	NUTRIENȚI CU EFECT REGULATOR
TRANSCRIPȚIA GENICĂ	VITAMINA D, RETINOIZI, COLESTEROL, ACIZI GRAȘI, GLUCOZĂ
STABILITATEA ARN_m	FIER, SELENIU, ACIZI GRAȘI, GLUCOZĂ
TRANSLAȚIA ARN_m	AMINOACIZI, FIER
PROCESAREA ARN_m	GLUCOZĂ, ACIZI GRAȘI POLINESATURAȚI
MODIFICĂRI POST-TRANSLAȚIONALE	MINERALE, VITAMINE

4.2. DIETA ȘI MODIFICĂRILE POST-TRANSLATIONALE ALE PROTEINELOR

Proteinele rezultate în urma procesului translațional suferă o serie de modificări:

- fosforilare – defosforilare;
- acilare;

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- acetilare;
- metilare,
- glicozilare;
- scindări proteolitice;
- cuplarea mineralelor sau vitaminelor la proteine determinând conversia apoenzimei în holoenzimă activă (ex.: cuplarea Mn la arginază, cuparea tiaminei la piridoxin-dehidrogenază).

Fiecare din aceste modificări **POST-TRANSLAȚIONALE** pot fi reglate de constituenții alimentari. Pe de altă parte orice defect al mecanismului post-translațional, poate determina schimbări majore în metabolism sau în funcționarea celulelor.

4.3. VARIABILITATEA GENETICĂ A POPULAȚIILOR UMANE ȘI DIETA

Polimorfismul genetic se manifestă în populațiile umane, în special sub forma **POLIMORFISMULUI MONONUCLEOTIDIC (SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS – SNPs)** și constă în **SUBSTITUȚIA UNUI SINGUR NUCLEOTID** în secvența de ADN (ex.: secvența ACGT poate fi înlocuită cu secvența AGGT).

Cantitatea și funcțiile proteinelor pot fi alterate prin mutații genetice de tip SNPs. Aceste mutații pot afecta oricare din numeroasele etape de conversie a codului genetic în proteine. Subtile mecanisme ale polimorfismului genetic se manifestă atunci când au loc variații ale secvenței de ADN, în regiuni non-transcriptibile ale genelor, afectând controlul transcripției genice, stabilitatea ARN_m sau rata de translație (2, 3).

Polimorfismul genetic cu semnificație nutrițională are consecințe importante asupra sănătății umane (Tabel 2).

În prezent se cunosc bine cerințele nutriționale pentru folații alimentari. Afectarea genei codante pentru enzima cheie **METILEN – TETRAHIDROFOLAT REDUCTAZĂ (MTHFR)** prin înlocuirea polimorfică a unei singure baze de **CITOZINĂ** cu **TIMIDINĂ**, determină schimbarea codonului care codifică alanina cu valină. Această, aparent minoră schimbare în secvența de aminoacizi, **reduce termostabilitatea enzimei**. Toți **indivizii mutanți homozigoți** sintetizează **MTHFR cu activitate scăzută** dar cu **niveluri plasmatice de homocisteină ridicate**, corelându-se cu un **înalt risc de apariție a aterosclerozei** (2).

Tabel 2

POLIMORFISMUL GENETIC (SNP_S) ŞI IMPACTUL ACESTUIA ASUPRA NUTRIŢIEI

PROCES CELULAR	GENE POLIMORFICE	IMPACT SĂNĂTATE / NUTRIŢIE
FUNCŢIA IMUNĂ	HLA (MHC), FACTOR α al necrozei tumorale, citokine	Măreşte susceptibilitatea la apariţia alergiilor alimentare (ex.: celiachie); modifică predispoziţia la apariţia cancerelor induse de dietă.
SĂNĂTATEA OASELOR	Receptor estrogenic, receptorul vitaminei D, colagen de tip I	Mediatori ai translocaţiei Ca, P, modulatori ai metabolismului osos, osteoporoză.
METABOLISMUL FOLAŢILOR	MTHFR, METIONIN – sintaza cistation beta-sintaza, glutamat carboxi-peptidaza III	Sindrom Down, maladii cardiovasculare, cancer, defecte de tub neural.
HOMEOSTAZIA FIERULUI	Hemocromatoza ereditară, linkaj genă HFE şi receptor transferină	Modularea necesarului de fier, anemie, supraîncărcare cu fier.
METABOLISMUL LIPIDELOR	Apolipoproteine (AIV, B, C_3, E), receptor LDL, lipoprotein-lipaza.	Reglează nivelul colesterolului sanguin şi al altor factori de risc pentru maladiile cardiovasculare.

Suplimentarea dietei cu **FOLAŢI** determină scăderea nivelului plasmatic al homocisteinei ceea ce are un efect de prevenţie a apariţiei aterosclerozei. Aceasta demonstrează faptul că este suficientă o singură substituţie a unei baze azotate în ADN, pentru a determina un efect fenotipic semnificativ, în expresia şi funcţionarea proteinelor.

Una dintre cele mai răspândite disfuncţii ereditare cu implicaţii nutriţionale este **HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIALĂ**. Aceasta este cauzată de mutaţii care afectează gena codantă pentru **RECEPTORII** lipoproteinelor cu masă moleculară mică (low – density lipoprotein LDL). Mutaţia în stare heterozigotă afectează 1 din 500 de persoane, inducând dezordini în clearance-ul colesterolului, care tinde să crească peste valori de 7,76 mmol/L. La persoanele homozigote pentru această mutaţie, nivelul colesterolului creşte de la vârste foarte tinere reducând speranţa de viaţă.

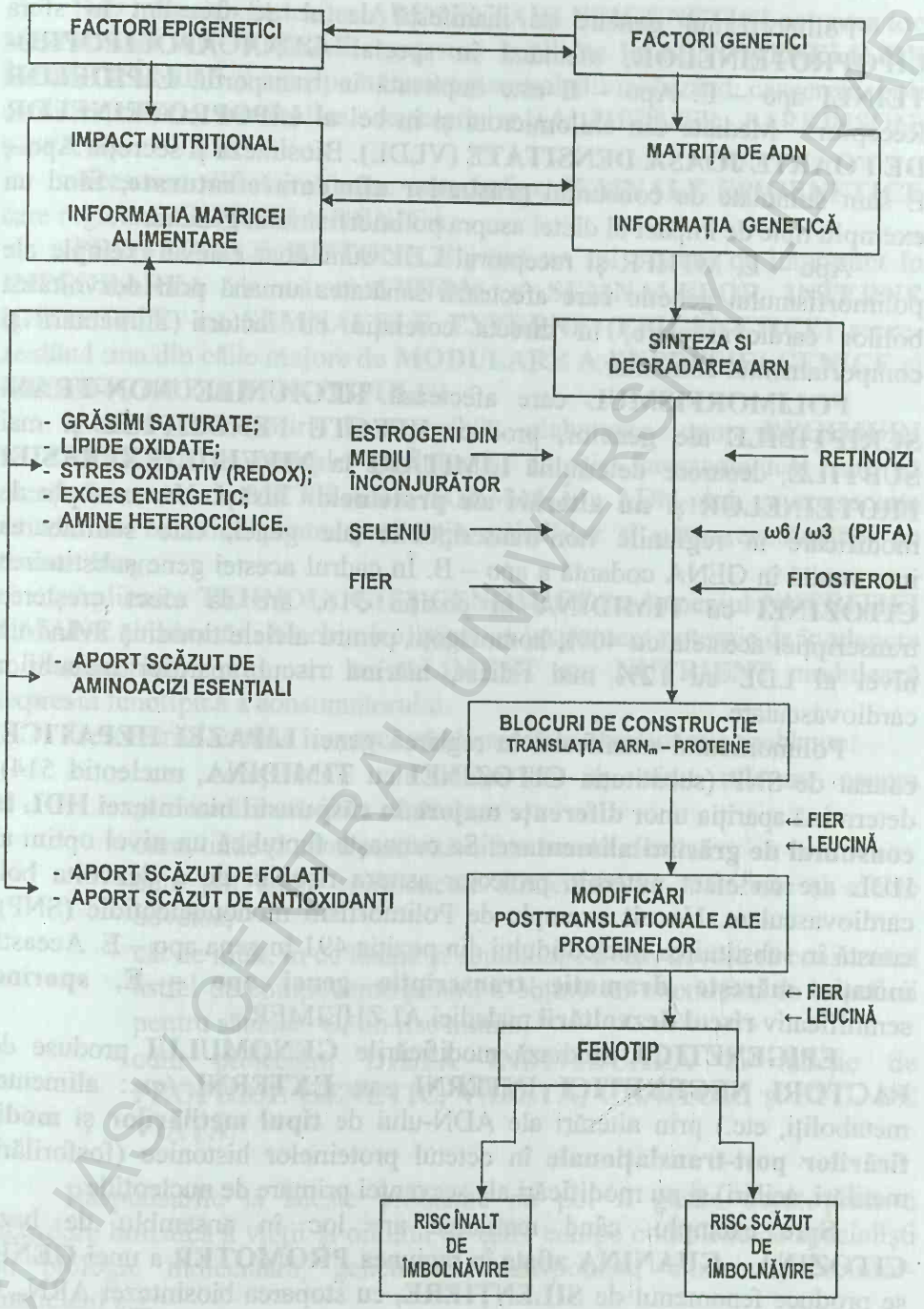

Fig. 2. Reglarea căilor de expresie a proteinelor de către nutrienți

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Polimorfismul genetic se manifestă destul de frecvent în sfera **LIPOPROTEINELOR**, afectând în special **GENA APOLIPOPROTEINEI** apo – E. Apo – E este implicată în transportul **LIPIDELOR** Receptor – Mediate din chilomicroni şi în cel al **LIPOPROTEINELOR DE FOARTE JOASĂ DENSITATE** (VLDL). Biosinteza şi secreţia Apo – E sunt stimulate de consumul **grăsimilor alimentare saturate**, fiind un exemplu tipic de impact al dietei asupra polimorfismului genetic.

Apo – E, MTHFR şi receptorul LDL sunt doar câteva exemple ale polimorfismului genetic care afectează sănătatea umană prin dezvoltarea bolilor cardiovasculare, în directa corelaţie cu factorii alimentari şi comportamentul alimentar.

POLIMORFISMUL care afectează **REGIUNILE NON-TRANSCRIPTIBILE** ale genelor, produce **EFECTE FENOTIPICE** şi mai **SUBTILE**, deoarece determină **LIMITĂRI** la **NIVELUL EXPRESIEI PROTEINELOR** şi **nu alterări ale proteinelor însăşi**. Un exemplu de modificare în regiunile non-transcriptibile ale genei, este schimbarea intervenită în GENA codantă a apo – B. În cadrul acestei gene substituirea **CITOZINEI** cu **TIMIDINA** în poziţia 516, are ca efect creşterea transcripţiei acesteia cu 40%, homozigoţii pentru alelele timidină având un nivel al LDL cu 12% mai ridicat, mărind riscul apariţiei maladiilor cardiovasculare.

Polimorfismul manifestat în reglarea genei **LIPAZEI HEPATICE**, cauzat de SNP (substituţia **CITOZINEI** cu **TIMIDINA**, nucleotid 514), determină apariţia unor **diferenţe majore în răspunsul biosintezei HDL la consumul de grăsimi alimentare**. Se cunoaşte faptul că un nivel optim al HDL are un efect puternic protector asupra riscului de a dezvolta boli cardiovasculare. Un alt exemplu de Polimorfism mononucleotidic (SNP), constă în substituirea nucleotidului din poziţia 491 în gena apo – E. Această mutaţie **măreşte dramatic transcripţia genei apo – E, sporind** semnificativ **riscul dezvoltării** maladiei ALZHEIMER.

EPIGENETICA studiază modificările **GENOMULUI** produse de **FACTORI NEGENETICI INTERNI** sau **EXTERNI** (ex.: alimente, metaboliţi, etc.) prin alterări ale ADN-ului de **tipul metilărilor** şi **modificărilor post-translaţionale** în octetul proteinelor histonice (fosforilări, metilări, acilări) şi nu modificări ale secvenţei primare de nucleotide.

Spre exemplu, când metilarea are loc în ansamblu de baze **CITOZINA – GUANINA** aflate în regiunea **PROMOTER** a unei **GENE**, se produce fenomenul de **SILENŢIERE**, cu stoparea biosintezei ARN_m şi proteinei corespunzătoare codate de gena respectivă.

Sub influenţa factorilor **ALIMENTARI EPIGENETICI** pot avea loc **METILĂRI ANORMALE**, care sunt implicate în **FENOMENELE DE ÎMBĂTRÂNIRE** şi apariţie a numeroase maladii incluzând: cancerele, boli cardiovasculare, metabolice, degenerative (ALZHEIMER, PARKINSON) ş.a. (2, 3).

Aceste modificări chimice sunt de fapt **SEMNALE EPIGENETICE** care reglează **EXPRESIA GENICĂ**.

PROTEINELE HISTONICE joacă un rol extrem de important în **INTEGRAREA** de către **GENOM** a **SEMNALELOR INTERNE (GENETICE)** cu **SEMNALELE EXTERNE (EPIGENETICE)** reprezentând una din căile majore de **MODULARE A EXPRESIEI GENICE** şi **MODIFICARE A FENOTIPULUI.**

Aceste descoperiri fac posibilă elaborarea unor **REGIMURI NUTRIŢIONALE** (terapie nutriţională, nutriţie farmacologică) care să menţină o stare de **METILARE NORMALĂ** a ADN-ului, cu consecinţe extrem de benefice pentru prevenţia maladiilor şi păstrarea sănătăţii pe termen lung.

Aplicarea **TEHNOLOGIEI GENOMICE** în domeniul **NUTRIŢIEI UMANE** şi cercetării biochimice, oferă un instrument puternic de înţelegere a mecanismelor prin care un **ALIMENT** sau **NUTRIENT** modulează expresia fenotipică a consumatorului.

Cercetările actuale încearcă să răspundă la următoarele probleme:

- care componente ale dietei au un efect relevant asupra promovării stării de sănătate;
- cum, unde şi când sunt exercitate aceste efecte;
- cum pot unele componente alimentare să manifeste şi efecte adverse;
- cât de mult, în ce formă şi combinaţie avem nevoie să consumăm astfel de componente pentru a obţine un maximum de beneficii pentru sănătate cu un risc minim;
- cum proiectăm **DIETA INDIVIDUALĂ** în funcţie de **PROFILUL GENETIC, VÂRSTĂ, GENITORI** şi **STIL DE VIAŢĂ.**

Răspunsurile la aceste probleme nu pot fi găsite decât printr-o abordare holistică a vieţii şi omului de către echipe complexe de specialişti în biologie moleculară, geneticieni, nutriţionişti, clinicieni, bioinformaticieni ş.a.

5. BIOLOGIA MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME

Microorganismele formează un grup vast şi heterogen de organisme diferite ca morfologie, activitate biologică şi poziţie sistematică, având însă caractere comune ca: dimensiunile microscopice, organizare în general unicelulară şi o structură internă relativ simplă. În acest grup sunt incluse bacteriile, fungii microscopici, algele microscopice şi protozoarele.

Dintre acestea, bacteriile şi fungii microscopici (drojdii sau levuri şi fungi filamentoşi) au o largă utilizare în procesele bioindustriale.

Bacteriile sunt unicelulare sau unicelulare-coloniale, au organizare celulară de tip procariot, delimitate de un perete celular rigid în constituţia căruia intră acizii mureinic, teichoic, diaminopimelic, care sunt absente la alte tipuri de organisme.

Levurile sau drojdiile sunt fungi microscopici care au pierdut capacitatea de creştere micelială şi au devenit unicelulare. Ele reprezintă o ramură minoră ca număr (circa 350 specii), dar deosebit de importantă din cauza numeroaselor utilizări practice, în special industriale. Înmulţirea (reproducerea) se realizează prin înmugurire şi diviziune.

Fungii filamentoşi sau mucegaiurile au corpul alcătuit din numeroase filamente,sunt microorganisme eucariote cu metabolism de tip chimiorganotrof.

Corpul lor este alcătuit dintr-un tal format prin creşterea împreună a numeroase filamente tubulare microscopice lungi şi subţiri numite hife, al căror ansamblu reprezintă un miceliu. Înmulţirea (reproducerea)se realizează prin spori.

5.1. METABOLISMUL MICROBIAN

Metabolismul reprezintă totalitatea reacţiilor biochimice implicate în activitatea biologică a microorganismelor respective, prin intermediul cărora energia şi elementele biogene (necesare creşterii), ca atare sau sub formă de combinaţii mai mult sau mai puţin complexe, sunt preluate din mediul şi utilizate pentru biosinteze, creştere, precum şi pentru alte activităţi celulare.

După cum reacţiile metabolice sunt însoţite de eliberare sau consum de energie, ele pot fi de două tipuri, reprezentând două feluri de căi metabolice:

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a) reacţii prin care se eliberează energie (exergonice), corespunzând catabolismului care furnizează (stochează) energia sub formă de ATP (legături chimice) sau alţi compuşi bogat energetici *şi*

b) reacţii prin care se consumă energie (endergonice), corespunzând anabolismului, care duc la sinteze de noi constituenţi celulari prin utilizarea energiei eliberate în primul proces.

Aceste două tipuri de reacţii sunt strâns interconectate, astfel încât degradarea substanţelor nutritive care furnizează energia duce la formarea de compuşi cu masă moleculară mică, dintre care unii servesc ca material de construcţie în căile de biosinteză prin asamblarea lor sub formă de macromolecule specifice microorganismelor respective. Datorită acestor particularităţi funcţionale, căile centrale ale metabolismului celular sunt denumite căi amfibolice.

Pentru a permite efectuarea sintezelor celulare şi în ultimă instanţă creşterea şi multiplicarea lor, microorganismele au nevoie de medii de cultură, care să le furnizeze bioelementele care intră în constituţia celulară.

Bioelementele majore (C, O, H, N, S, P, K, Mg, Ca, Fe) sune necesare în concentraţii relativ mari ($>10^{-4}$ M), deoarece reprezintă principalii constituenţi ai compuşilor organici celulari.

Dintre bioelementele minore, necesare numai în cantităţi foarte mici, unele (Zn, Mn) sunt esenţiale pentru toate microorganismele, în timp ce altele (Mo, Co, Cu, W) sunt necesare numai în cazul unor activităţi metabolice speciale.

Considerate în ansamblu, microorganismele sunt organismele cele mai tipic omnivore, deoarece îşi pot realiza metabolismul utilizând foarte numeroase şi diferite surse de substanţe nutritive, de la N molecular, CO_2, S şi până la substanţele organice complexe.

Ţinând seama de natura sursei de energie şi a principalei surse de carbon, microorganismele prezintă următoarele tipuri de metabolism:

1. Microorganisme fototrofe, care utilizează pentru activităţile lor biologice energia radiantă luminoasă, având capacitatea de fotosinteză.
2. Microorganisme chimiotrofe care au capacitatea de a folosi energia liberată prin reacţii chimice oxidative la întuneric.

În raport cu capacitatea de biosinteză a metaboliţilor esenţiali, microorganismele îşi pot desfăşura activităţile biologice printr-una din următoarele modalităţi de nutriţie:

1. Autotrofia, care corespunde capacităţii de sinteză a tuturor constituenţilor celulari, pornind de la surse anorganice simple de C şi N.

2. Heterotrofia, care implică incapacitatea de sinteză a unor metaboliți esențiali și decurgând din aceasta, nevoia obținerii lor din mediu ca substanțe deja existente, preformate.

5.2. METABOLISMUL ENERGETIC

Energia necesară diferitelor activități biologice (transport prin membrane, biosinteze, mobilitate etc.) este obținută prin reacțiile metabolismului energetic, care în cazul microorganismelor heterotrofe constau în degradarea unor substanțe organice de multe ori cu structură complexă. Căile catabolismului la microorganisme sunt numeroase și uneori specifice. În cazul microorganismelor heterotrofe, diversitatea și complexitatea lor variază în funcție de natura moleculelor folosite ca sursă de C. Liberarea de energie în procesele de catabolism se realizează însă totdeauna în trei faze distincte.

În prima fază a catabolismului, macromoleculele de origine biologică sunt descompuse la unitățile lor de construcție: proteinele la aminoacizi, grăsimile la glicerol și acizi grași, iar glucidele la hexoze, pentoze etc., liberându-se de obicei mai puțin de 1% din energia totală a macromoleculelor, care în bună parte se pierde sub formă de căldură.

În a doua fază, diferitele molecule rezultate în faza precedentă sunt degradate în continuare în mod incomplet, cu liberarea unei treimi din energia lor totală, însoțită de formarea de CO_2, H_2O și a numeroși alți produși diferiți (circa – 2 – 300 la E. coli și probabil, un număr mult superior la bacteriile care pot degrada multe substanțe de natură diferită). Acești produși reprezintă cu toții intermediari ai căilor metabolice centrale.

Cea de-a treia fază a procesului de liberare a energiei se realizează pe două căi: a) la microorganismele care pot descompune integral substanțele nutritive până la CO_2 și H_2O procesul final se desfășoară pe calea acizilor tricarboxilici; b) la microorganismele care realizează numai o descompunere parțială a substratului lor nutritiv, liberarea de energie este mult mai slabă și rezultă din reacții de fermentație.

Întrucât sistemele biologice nu pot utiliza și nici tolera liberările drastice de energie, care se traduc de regulă prin ridicări brutale de temperatură, ca în reacțiile organice simple, celulele își pot coordona desfășurarea metabolismului energetic printr-un dublu proces de eliberare fracțională a energiei și stocarea celei excedentare în vederea unei utilizări ulterioare.

Sursa de energie pentru microorganismele producătoare de enzime este reprezentată de diferiţi compuşi organici (glucide, lipide şi proteine), care suferă o serie de degradări prealabile în cursul catabolismului celular.

Sursa de energie cel mai frecvent utilizată de microorganisme şi introdusă în mod deliberat în mediile de cultură este reprezentată de compuşii glucidici, al căror metabolism este de altfel, cel mai bine cunoscut.

Punctul de plecare al proceselor producătoare de energie este reprezentat de glucoză, al cărei metabolism are loc, de regulă, pe calea unor reacţii, catalizate de enzime corespunzătoare procesului de glicoliză având drept rezultat formarea a două molecule de acid piruvic,

În funcţie de comportarea lor faţă de oxigenul molecular care reflectă mecanismul prin care microorganismele îşi desfăşoară metabolismul energetic, acestea pot fi grupate în patru tipuri respiratorii:

1) Microorganismele strict sau obligatoriu aerobe, care folosesc O_2 ca acceptor final de H în ultima etapă a transferului de electroni în sistemul citocromilor; ca urmare ele au nevoie de prezenţa continuă a oxigenului atmosferic. Microorganismele aerobe dispun de un sistem citocromic funcţional ca şi de unele enzime ca peroxidaza, catalaza şi superoxid dismutaza.

Aceasta din urmă, prezentă la aerobe şi aerotolerante este esenţială pentru protejarea microorganismelor de toxicitatea oxigenului şi a O^-_2 (radicalul superoxid).

Incapacitatea lor de a trăi în anaerobioză s-ar datora lipsei enzimelor respiratorii necesare respiraţiei anaerobe sau faptului, că, pentru ele, produşii finali ai respiraţiei anaerobe sunt toxici.

2) Microorganismele strict sau obligatoriu anaerobe nu se pot dezvolta în prezenţa oxigenului molecular şi, ca urmare, se pot cultiva numai în medii sărăcite în oxigen.

3) Microorganismele aerobe facultativ anaerobe sunt cele mai numeroase şi sunt capabile să-şi orienteze metabolismul (spre respiraţie sau spre fermentaţie) în funcţie de disponibilităţile de O_2 au în mod obişnuit un metabolism de tip anaerob, fără însă a fi sensibile la prezenţa O_2. Unele dintre microorganismele de acest tip respirator, şi anume levurile, pot trece de la metabolismul aerob la cel anaerob în funcţie de condiţiile de mediu.

4) Microorganismele microaerofile au nevoie de o cantitate de O_2 mai mică decât aceea din aerul atmosferic. Această particularitate s-ar datora sensibilităţii unora dintre enzimele lor la condiţiile de oxidare puternică.

Ca urmare a activităţilor metabolice bacteriile şi fungii microscopici produc două categorii de metaboliţi:

Metaboliții primari sunt substanțe de tipul alcoolilor simpli, ai acizilor și aldehidelor sau CO_2, H_2, CH_4 etc., care sunt formați în faza de creștere exponențială a microorganismelor, ca rezultat al metabolismului oxidativ sau fermentativ.

Metaboliții secundari sunt de regulă substanțe chimice mai complexe, elaborate în cursul unei scurte perioade la începutul fazei staționare de creștere și produși, adeseori, în cantități deosebit de mari, deși nu au o funcție metabolică evidentă. Numărul metaboliților secundari este foarte mare și structura lor chimică foarte diferită. Unii au valoare comercială ca medicamente: penicilina, streptomicina, ergometrina etc., în industrie sau în agricultură.

Sinteza metaboliților secundari se realizează pe seama constituenților cu masa moleculară mică, folosiți în timpul creșterii exponențiale pentru sinteza constituenților celulari normali și este rezultatul acumulării în mediu a unei substanțe care acționează ca inductor sau a epuizării unei substanțe cu funcție de represor.

Semnificația biologică a metaboliților secundari nu este cunoscută. Sinteza lor ar reprezenta rezultatul unor „erori de metabolism", fără importanță pentru microorganism. Deși după multe date experimentale ei ar avea o importanță cu totul deosebită. Se apreciază că, în ciuda eficienței mecanismelor celulare de reglare, în cursul fazei staționare de creștere, viața microorganismelor ar fi periclitată din cauza acumulării unor concentrații mari de compuși cu masă moleculară mică. Formarea metaboliților secundari ar putea fi interpretată ca un proces care duce la atenuarea acestor dificultăți, prin convertirea metaboliților intermediari acumulați în produse inofensive.

5.3. BIOSINTEZA PROTEINELOR

Structura proteinelor – agenți universali ai activității biologice, fie ea biochimică, fiziologică sau morfogenetică – este legată de aceea a acizilor nucleici, agenți universali ai conservării, exprimării și transmiterii potențialului ereditar, iar structura fiecărei proteine în parte este riguros definită de o porțiune determinată a materialului genetic al celulei.

Biosinteza proteinelor implică transmiterea informației genetice de la molecula de acid nucleic, unde este codificată, la „dispozitivul" celular producător de proteine – ribozomii – în așa fel încât secvența nucleotidelor să se traducă printr-o anumită secvență a aminoacizilor în lanțul polipeptidic care constituie structura de bază a proteinei.

5.4. MORFOGENEZA PROTEINELOR

Odată formate, lanțurile polipeptidice suferă modificări de configurație rezultând din stabilirea unor legături intercatenare. Structura primară sau secundară a proteinelor se datorează legăturilor intracatenare, iar structura lor terțiară sau cuaternară ține de constituirea legăturilor intercatenare care le conferă diferite configurații spațiale. La bacterii, viteza sintezei proteinelor este foarte mare.

Viteza de sinteză este însă de cel puțin 100 ori mai mică în medii acelulare, de unde reiese că în procesele de biosinteză proteică, în afară de prezența informației genetice, a mesagerilor, a precursorilor și a unor factori de mediu adecvați, o mare importanță au și fenomenele de reglare fină care au loc în celula vie.

5.5. REGLAREA SINTEZEI ȘI ACTIVITĂȚII ENZIMELOR

Creșterea și multiplicarea microorganismelor ca și producerea diferitelor substanțe biologic active sunt subordonate funcționării coordonate a unui număr mare de sisteme enzimatice care catalizează diferitele reacții biochimice implicate în metabolismul celular.

Natura, cantitatea și activitatea acestor enzime sunt reglate în așa fel încât să asigure celulelor un echilibru stabil sub raportul conservării caracterelor lor specifice, dar în același timp suficient de suplu și de dinamic pentru a le permite o adaptare continuă la condițiile schimbătoare ale mediului.

Datorită acestui fapt deși materialul genetic al unui microorganism conține informația genetică necesară pentru producerea unei mari varietăți de enzime, numai unele dintre acestea (enzimele constitutive) sunt produse în permanență, indiferent de prezența sau absența substratului lor din mediu.

Concentrația altor enzime (inductibile) este foarte mult influențată de prezența substratului lor. În absența substratului inductor, mecanismele de sinteză a enzimei sunt inhibate pentru a fi puse în funcțiune ori de câte ori substratul este prezent.

În sistemele de biosinteză, cantitatea și activitatea enzimelor poate fi influențată de produsul final al acțiunii lor sau de un metabolit intermediar. Aceasta face ca diferitele procese biochimice care au loc în celula microbiană să evolueze, nu la întâmplare, ci în mod coordonat, în raport cu necesitățile din fiecare moment ale celulei.

Aşa se explică de ce, cu toate că în reacţiile metabolice sunt implicaţi sute de metaboliţi intermediari diferiţi, numai foarte puţini dintre ei se acumulează în exces, devenind decelabili în mediul de cultură. Funcţionarea armonioasă a tuturor mecanismelor fiziologice celulare face ca în condiţii normale, nici o proprietate să nu se manifeste în mod anarhic.

Mecanismele de reglare reprezintă deci un sistem de coordonare în care se integrează într-un tot unitar:

a) selecţia adecvată în raport cu mediul a informaţiei genetice;
b) procesele de transcriere a acestei informaţii în vederea biosintezei proteinelor după programul codificat în gene;
c) realizarea cantitativ echilibrată a acestei sinteze, *şi*
d) desfăşurarea reacţiilor implicând activitatea catalitică a proteinelor sintetizate.

Mecanismele de reglare a activităţii celulare, se exercită la trei nivele diferite care sunt în ordinea crescândă a complexităţii lor următoarele: 1) activitatea enzimelor; 2) biosinteza proteinelor enzimatice, reglată prin cele două mecanisme esenţiale care sunt inducţia şi represia; 3) multiplicarea celulară realizată prin diviziune.

Numeroase enzime catabolice sunt inductibile şi au ca inductori tipici substratele pe care acţionează.

Unii inductori sunt foarte activi şi pot mări producţia enzimelor inductibile chir de 1000 de ori, în aşa fel încât celula bacteriană poate produce enzima respectivă în cantităţi care reprezintă mai multe procente din proteina lor celulară.

Adeseori cei mai puternici inductori sunt analogi ai substratului care reprezintă substraturi ineficiente pentru enzimă şi pentru metabolismul organismului respectiv.

5.6. REPRESIA SINTEZEI ENZIMELOR

Represia enzimatică reprezintă fenomenul de reducere a vitezei de sinteză a unei enzime sau a unui grup de enzime metabolic înrudite sau chiar de stopare a elaborării lor, ca urmare a prezenţei în celulă a unui metabolit represor, reprezentat de produsul final al unei secvenţe anabolice sau un analog al produsului acestei reacţii de sinteză.

În cazul cultivării pe medii complexe, prezenţa fiecăruia din aceşti produşi terminali ai unei căi de biosinteză reprezintă un semnal pentru celulă, care, printr-un fenomen de represie prin produs final, opreşte sinteza enzimei devenită inutilă, întrucât microorganismul foloseşte cu precădere metabolitul existent ca atare în mediu.

5.7. REPRESIA PRIN CATABOLIT

Represia prin catabolit constituie un tip particular de represie enzimatică, acționând asupra unor enzime catabolizante, prin blocarea specifică a sintezei lor.

Represia prin catabolit a biosintezei enzimelor este foarte importantă, deoarece numeroase enzime cu importanță actuală sau de perspectivă pentru industrie și cercetare sunt supuse acestui tip de reglare. Evitarea prezenței în mediile de cultură a unor surse de carbon cu rol de represie va stimula producerea crescută de câteva ori a enzimelor sensibile la represia prin catabolit.

5.8. INHIBIȚIA ACTIVITĂȚII ENZIMELOR (INHIBIȚIA PRIN PRODUS FINAL, RETROINHIBIȚIA SAU INHIBIȚIA PRIN FEEDBACK)

Pe lângă mecanismele de reglare ale concentrației enzimelor, celula bacteriană dispune de dispozitive care adaptează activitatea enzimelor la necesitățile metabolismului. Prin acest mecanism ori de câte ori un monomer este produs în cantități mai mari decât este necesar pentru sinteza polimerilor, se realizează nu numai stoparea sintezei enzimelor implicate în formarea lui, ci și reducerea imediată a formării monomerului respectiv prin inhibarea activității primei enzime implicată specific în formarea sa.

Sinteza și secreția exoproteinelor.

Deși procesul de biosinteză a proteinelor este bine cunoscut la nivel molecular, multe aspecte ale formării și secreției exoproteinelor se bazează pe date experimentale.

Sinteza exoproteinelor la bacterii

În condiții corespunzătoare de creștere, cele mai multe bacterii sintetizează și secretă exoproteine în tot cursul ciclului de creștere, deși în unele cazuri acest proces se realizează mai intens în celulele aflate în faza staționară.

Examinarea citoplasmei celulelor care secretă activ exoproteine a arătat fie absența completă a acestora, fie prezența lor numai sub formă de urme.

Mecanismul secreției exoproteinelor

Secreția exoproteinelor corespunde trecerii lor prin membrana plasmatică. Proteinele care au suferit acest transfer se numesc extracelulare sau exoproteine (Glenn, 1976).

6. CINETICA REACȚIILOR ENZIMATICE

Enzimele sunt biocatalizatori organici, coloidali, specifici aparținând prin natura lor chimică proteinele sau proteidelor.

Enzimele din grupa proteindelor sunt compuse dintr-o parte proteică și o grupă prostetică asociată. Grupa prostetică legată cu diferite grade de stabilitate de gruparea proteică poartă denumirea de coenzimă sau cofactor. Partea proteică primește numele de apoenzimă.

Apoenzima este purtătoarea caracterelor care determină specificitatea de substrat și dirijează specificitatea de acțiune în care este implicată și coenzima. Moleculele enzimatice constau din lanțuri polipeptidice unice sau rezultă prin asamblarea mai multor asemenea lanțuri. Enzimele posedă structurile caracteristice tuturor proteinelor comportând patru grade de complexitate: structură, primară, secundară, terțiară și cuaternară. Masa moleculară a enzimelor variază de la ordinul miilor la cel al milioanelor ($9\times10^3 - 10^6$). Compoziția și secvența aminoacizilor constituind structura primară precum și numărul lanțurilor polipeptidice sunt caracteristice fiecărei proteinenzime. Structura primară determină celelalte trei structuri, proprietățile fizico-chimice, configurația tridimensională și proprietățile imunologice ale proteinenzimei. Lanțul polipeptidic are o structură repetitivă particulară reprezentată printr-o configurația α – helicoidală dreaptă, foarte stabilă.

Cele mai importante categorii de forțe intermoleculare care participă la formarea configurației acestor biopolimeri atât în soluție cât și în sistemele biologice sunt: legăturile covalente (legături disulfidice inter și intracatenare), legăturile ionice (forțe electrostatice de atracție sau repulsie influențate de temperatură, tărie ionică, pH), punțile de hidrogen, forțe Van der Waals (forțe de interacțiune dipol-dipol, dipol-dipol indus și de dispersie), forțe de rezonanță, forțe de interacțiune hidrofobe.

În cazul proteinenzimelor specificitatea funcțională este deci rezultatul unei anumite conjuncturi topografice, realizată prin structurarea tridimensională a unuia sau mai multor lanțuri polipeptidice. Devine astfel eficientă în mod specific, o anumită zonă activă (centrul catalitic activ, situs catalitic), care cuprinde un număr relativ mic de aminoacizi reprezentând uneori o parte restrânsă din întreaga proteină, prin care se manifestă conținutul informațional al acesteia.

Centrul activ nu este situat în interiorul unui singur lanț peptidic. Acesta poate cuprinde grupuri care se dispun în două sau mai multe lanțuri peptidice, fiind conținute într-un plan care poate secționa transversal în mai

multe puncte un lanț peptidic cu o anumită aranjare spațială. Reactivitatea centrului activ depinde astfel nu numai de existența situsului de combinare cu substratul, dar şi de aranjarea spațială a grupelor de contact, deci de configurația întregului edificiu proteic.

6.1. DEPENDENȚA DE pH A VITEZEI REACȚIILOR ENZIMATICE

Viteza reacțiilor enzimatice este maximă la o anumită valoare a pH-ului mediului de reacție şi scade pe măsura îndepărtării de această valoare spre extreme acide sau bazice. Influența pH-ului este de obicei complexă, cuprinzând: a) influențarea vitezei maxime de reacție; b) influențarea afinității enzimei pentru substrat, manifestată prin scăderea concentrației complecşilor intermediari; c) modificarea reversibilă sau ireversibilă a structurii catalizatorului enzimatic.

6.2. DEPENDENȚA DE TEMPERATURĂ A VITEZEI REACȚIILOR ENZIMATICE

Cauzele influenței temperaturii asupra vitezei reacțiilor enzimatice sunt complexe dar determinarea cantitativă a acestor efecte este aproape automat efectuată în cadrul studiilor diferitelor reacții enzimatice.

Pentru anumite domenii de temperatură, viteza reacțiilor enzimatice creşte odată cu creşterea temperaturii.

6.3. INHIBIȚIA CATALIZEI ENZIMATICE

Analiza catalizei enzimatice în condiții de inhibiție oferă date despre condițiile concrete ale desfăşurării procesului.

Inhibiția competitivă. Se produce prin fixarea inhibitorului la centrii activi, blocând acțiunea catalitică a acestora.

Inhibiția competitivă parțială: inhibitorul modifică afinitatea enzimei pentru substrat, dar nu se leagă de centrii activi ai catalizatorului.

Inhibiția necompetitivă. Inhibitorul nu se fixează pe centrii activi ai enzimei, capacitatea catalitică a acestora nu este anulată ci doar diminuată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.4. ACTIVATORII CATALIZEI ENZIMATICE

Unele specii chimice pot stimula o reacție enzimatică, modificând fie afinitatea enzimei pentru substrat ($1/K_m$), fie viteza maximă de reacție. Adeseori ei sunt cationi metalici (Na^+, K^+, Rb^+, Cs^+, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, NH^+_4), cu volum mic (rază ionică în domeniul 0,78 – 1,03Å, ale căror acțiuni sunt destul de specifice (Mg^{2+} poate fi înlocuit cu Mn^{2+}; și Ni^{2+} se pot înlocui în cazul câtorva enzime). Se cunosc cazuri de antagonisme ionice (Na^+ acționează ca inhibitor al acțiunii K^+; Ca^{2+} ca inhibitor al acțiunii Mg^{2+}).

6.5. SPECIFICITATEA CATALIZEI ENZIMATICE

Dacă există evidente asemănări între catalizatorii chimici și cei enzimatici, există și deosebiri esențiale, cantitative (energiile de activare necesare formării complecșilor intermediari sunt mult mai mici, enzimele nu acționează la valori extreme de pH și temperatură) și calitative – din care în mod special extraordinara specificitate a catalizei enzimatice, în sensul limitării fiecărei enzime la o singură substanță sau mult mai rar, la câteva substanțe asemănătoare.

Specificitatea catalizei enzimatice este cu certitudine legată de posibilitatea cuplării substratului la anumite zone bine definite ale proteinei, de interacțiunile reciproce care determină modificări conformaționale ale enzimei și orientări spațiale specifice ale substratului, de geometria zonelor active. Specificitatea este chimică, sterică (enzima acționează numai asupra unuia din izomerii optici, principiu utilizat industrial la separarea amestecurilor racemice în enantiomeri), geometrică (enzima acționând numai asupra uneia din formele cis sau trans – de exemplu fumaraza acționează asupra ionului fumarat, dar nu și asupra ionului maleat) sau chiar atât de stricta încât catalizatorul distinge între doi substituenți identici (a' și a") ai unui atom de carbon tetrasubstituit.

7. BIOSINTEZA INDUSTRIALĂ A ENZIMELOR

Biotehnologia producerii preparatelor enzimatice se bazează pe principiul cultivării microorganismelor în instalații industriale speciale, asigurându-se producătorilor condiții optime de creștere, dezvoltare și biosinteză a metaboliților doriți.

Formarea produşilor metabolici este corelată cu anumite faze de dezvoltare a microorganismelor. Se impune deci necesitatea conducerii şi reglării creşterii şi dezvoltării microorganismelor producătoare, pentru a determina funcţionarea selectivă a anumitor căi metabolice pentru acumularea preferenţială a metabolitului dorit. Aceasta face ca în comparaţie cu tehnica reactorului chimic, tehnica reactorului biologic să necesite mai multă aparatură de măsură şi control.

7.1. ETAPELE ELABORĂRII TEHNOLOGIILOR DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

Elaborarea şi industrializarea tehnologiilor de biosinteză a enzimelor se realizează parcurgând o serie de faze necesare constând în cercetări la nivel de laborator, staţie pilot, staţie industrială experimentală, unitate industrială de producţie. În cadrul acestor faze se deosebesc mai multe trepte de transpunere a biotehnologiilor în producţie.

Faza de laborator

Procesul de bază din tehnologia de biosinteză a enzimelor este proces microbiologic.

Cercetările încep prin izolarea din diferite habitate a unui mare număr de microorganisme cunoscute sau presupuse a elabora enzimele dorite. Tehnicile de izolare şi purificare a culturilor de microorganisme sunt cele descrise în manualele de specialitate, mai frecvent utilizate fiind: tehnica diluţiilor, tehnica granulelor de sol. Deseori sunt create condiţii selective de cultură a microorganismelor pe medii solide sau lichide conţinând anumite principii cu ajutorul cărora se pot evidenţia unele caracteristici fiziologice. După etapa de izolare şi realizare a culturilor pure prin tehnici directe de micromanipulare sau indirecte (epuizarea ansei, diluţii etc.), se trece la trierea (screening) tulpinilor luate în lucru după criterii calitative şi cantitative, conform scopului urmărit. Principiul acestor teste calitative constă în cultivarea microorganismelor în plăci Petri pe medii solidificate cu agar-agar, conţinând substratele naturale ale enzimelor dorite. După dezvoltarea coloniilor izolate, enzimele difuzează în gelul de agar-agar atacând substratul inclus în mediu. Interpretarea rezultatelor se face după adăugarea unui reactiv specific substratului (amidon-Lugol cazeină-reactiv TCA, Frazier) prin apariţia unei zone de hidroliză în jurul coloniei. Cu cât această zonă este mai extinsă cu atât microorganismul respectiv este mai bun producător.

Testele cantitative se efectuează prin determinarea precisă a activității enzimatice a extractelor sau lichidelor de biosinteză prin metode spectrofotometrice, de fluorescență, titrimetrice, polarimetrice, manometrice.

În urma acestor teste se reţin numai câteva tulpini care sunt apoi cercetate în vederea identificării şi caracterizării după criterii morfologice, biochimice, fiziologice, imunologice, virulență-patogenitate, sensibilitate la fagi, toxicologie etc.

Pe baza acestor date se întocmeşte o fişă de identitate a tulpinii fiind înregistrată în colecție sub un număr de identificare.

O problemă esențială pentru realizarea procesului de biosinteză la scară industrială constă în stabilirea cauzelor care duc la variabilitatea rezultatelor pe fond tehnologic. Deseori modificări neînsemnate ale condițiilor de lucru ca înlocuirea unei surse de azot cu altă sursă, aerația variabilă, nerespectarea temperaturii optime de biosinteză conduc la dereglarea capacității de biosinteză a producătorului. Pe de altă parte variabilitatea calității materiilor prime utilizate în procesele industriale de biosinteză (făină de porumb, extractul de porumb, şrot de soia şi floarea soarelui, melasă etc.) determină o nereproductibilitate a şarjelor.

Pentru executarea lucrărilor de microbiologie şi genetică descrise, laboratorul trebuie să posede spații special amenajate pentru: pregătirea şi sterilizarea mediilor de cultură necesare manipulării microbiologice şi genetice, dezvoltării în suprafață sau submerse a microorganismelor supuse testării.

Pentru pregătirea mediilor de cultură sunt necesare balanțe cu diferite grade de precizie, dispozitive de repartizare, instalații pentru sterilizare utilizând diferiți agenți fizico-chimici sau ultrafiltrarea.

În laboratorul de microbiologie este necesar ca posibilitatea contaminării aerului să se diminueze cât mai mult, în comparație cu restul laboratoarelor. Camera sterilă devine astfel necesară. În locul unei camere se pot utiliza nişe de inoculare.

La proiectarea unei camere sterile trebuie avute în vedere câteva aspecte. Distanța între camera sterilă şi camerele cu temperatură controlată (termostat, criostat) trebuie să fie mică. Dimensiunile camerei trebuie să fie în aşa fel încât să încapă două spații de lucru şi câteva mese libere pentru depozitarea materialelor necesare lucrărilor respective. Dacă este nevoie de un spațiu mai mare se vor proiecta mai multe subansamble în locul unei singure camere mai mari. Camera trebuie prevăzută cu obturator de aer sau cu un spațiu delimitat de o uşă dublă.

În acest spațiu se montează o chiuvetă cu apă caldă şi rece, recipienți cu dezinfectante pentru mâini şi alte scopuri, uscător electric pentru mâini

(de preferat în locul prosoapelor de hârtie), spații pentru depunerea halatelor. În lipsa obturatorului de aer uşa de legătură va fi prevăzută cu geam dublu, montarea lor făcându-se cu mare grijă pentru a se evita orice curent de aer în camera sterilă. Deoarece depunerea prafului poate reprezenta o sursă de contaminare, se va evita proiectarea suprafețelor inaccesibile sau a colțurilor, iar camera însăşi şi închizătorul cu aer vor fi astfel construite încât să poată fi uşor curățate. Pereții vor fi netezi şi fără crăpături, acoperiți de preferință cu vopsea lavabilă. Planşeul trebuie construit de asemenea dintr-un material uşor de curățat şi dezinfectat.

Camera va fi prevăzută cu instalație electrică şi de gaz, apă caldă şi rece, priză de aer, vid şi vapori. Nu este necesar mult mobilier, evitându-se dulapurile de perete care îngreunează operațiile de sterilizare a camerei.

Culoarea mesei de lucru va fi de preferat închisă, spațiul de lucru fiind parțial iluminat de jos facilitând izolarea coloniilor.

Sterilizarea camerei se realizează cu agenți chimici (etilenglicol, propilen glicol, formaldehidă, excesul fiind neutralizat cu amoniac) şi fizici. Cel mai frecvent sunt utilizate razele ultraviolete cu lungimea de undă de 2537 Å, emise de lămpi germicide din cuarț cu vapori de mercur de joasă presiune, montate în plafon lângă uşă. Pentru a distruge 90% din microorganisme pe unitatea de suprafață sunt necesari 2 – 5 $mW/S/cm^2$. Lampa germicidă de 15 W, la distanța de 30 cm emite o energie de ordinul a 400 μw. Dacă aerul este forțat să treacă peste tubul emițător de raze U.V., se va obține o eficiență sporită a sterilizării.

Lampa bactericidă este comandată din afara camerei sterile aprinzându-se înaintea lucrului în cameră şi se va stinge în timpul lucrului în cameră.

Dacă se dispune de aer sterilizat, camera se poate ventila, menținându-se o uşoară suprapresiune în interior reducându-se astfel posibilitatea contaminării din exterior. O metodă mai nouă de creare a unui mediu lipsit de microorganisme constă în utilizarea incintelor sterilizabile cu circulație laminară forțată a curenților de aer sterilizat.

Astfel de camere zise curate au fost clasificate funcție de numărul maxim de particule cu dimensiuni de 0,5 μm pe litru de aer în următoarele clase: clasa 100 (3,5 particule/l), clasa 100000 (350 particule/l), clasa 100000 (3500 particule/l).

Pentru dezvoltarea microorganismelor la nivel de laborator în culturi de suprafață sau solide se utilizează flacoane de diverse forme.

Faza de stație pilot

În faza de stație pilot tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată şi optimizată în instalații de biosinteză având capacități mai mari.

Biosinteza enzimelor se desfăşoară în reactoare biologice în culturi de suprafaţă sau submerse în funcţie de fiziologia producătorului şi urmărind economicitatea procesului.

În această fază se aleg modalităţile cele mai potrivite pentru prelucrarea mediului de cultură şi obţinerea preparatelor enzimatice.

Cercetările sunt continuate în instalaţii industriale experimentale pentru a se putea studia comportarea microorganismelor precum şi stabilirea bilanţurilor de materiale şi energetice. În această fază se stabilesc şi preţurile de cost orientative ale produsului. Pe baza rezultatelor obţinute în staţiile pilot şi în staţiile industriale experimentale se elaborează tehnologia industrială de producţie şi proiectul pentru construcţia unităţii industriale.

7.2. SISTEME DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

Biotransformările cuprinzând procese de biosinteză sau biodegradare, pot avea loc în condiţii oxibiotice, anoxibiotice sau fermentative. În mod impropriu termenul generic de „fermentaţie" este folosit în practică şi pentru unele procese bazate pe cultivarea microorganismelor în condiţii de aerobioză riguroasă.

Procesele biotehnologice se pot clasifica după: felul culturii (suprafaţă, submers), tipul de operare şi reactor, după modul de transformare al componentelor nutritive ale mediului de cultură.

În ceea ce priveşte conducerea procesului de obţinere a enzimelor se deosebesc:

- procedeul de biosinteză în culturi de suprafaţă, semisolide şi solide;
- procedeul de biosinteză în culturi submerse.

În cazul culturilor de suprafaţă microorganismele se dezvoltă pe suprafaţa unui suport lichid sau solid, iar în cazul culturilor solide microorganismul se dezvoltă atât în suprafaţă cât şi în interiorul mediului de cultură de obicei granulat (exemplu dezvoltarea ficomicetului *Mucor pusillus* pe mediul de tărâţe de grâu în tăvi introduse în incubatoare speciale).

Culturile semisolide se realizează în tambure rotative pe medii semisolide care nu se aglomerează. Tamburul de formă cilindrică aşezat orizontal se roteşte în jurul axului lung fiind montat pe role, iar în interior este prevăzut cu palete sudate de-a lungul generatoarei care antrenează mediul în timpul învârtirii asigurând o bună aerisire.

Aerul sterilizat necesar aerării mediului se introduce prin ax. Aparatul poate fi sterilizat cu abur şi lucrează sub presiune de aer.

Procedeele de suprafaţă necesită instalaţii numeroase, sunt costisitoare, ocupă mult spaţiu şi sunt greu sterilizabile. Din cauza manipulării uşoare acest procedeu se utilizează mai mult în regim de laborator.

Procedeele submerse necesită instalaţii care permit o amestecare perfectă a componentelor solide, lichide şi gazoase ale mediului de biosinteză, o alimentare adecvată cu aer, fiind echipate cu aparatură de măsură şi control.

Acest procedeu oferă o serie de avantaje, faţă de cultura în suprafaţă, printre care: randamente ridicate în produs, se pretează automatizării, economie de spaţiu şi forţă de muncă.

Industrial, cultura submersă a microorganismelor se poate realiza prin procese discontinue sau continue, acestea din urmă conducând la utilizarea de aparate mai mici în care se pot menţine parametrii optimi de biosinteză cu investiţii mai mici şi economie de timp.

7.2.1. Bioreactoare pentru procedeul culturilor de suprafaţă

Există două tipuri de bioreactoare pentru diferite procedee biotehnologice.

7.2.2. Bioreactoare pentru procedeul culturilor submerse

După tipul respirator al microorganismelor utilizate în procesele biotehnologice, reactoarele biologice se împart în:

- bioreactoare pentru procedeul submers anaerob;
- bioreactoare pentru procedeul submers aerob.

1) **Bioreactoare pentru procedeul submers anaerob** – se utilizează în general tancuri simple, gazate cu azot sau bioxid de carbon pentru a împiedica pătrunderea oxigenului în mediu, prevăzute deseori cu dispozitive de amestecare, termostatare etc.

2) **Bioreactoare pentru procedeul submers aerob** – sunt asemănătoare cu cele pentru procesele anaerobe, dar sunt prevăzute întotdeauna cu dispozitive de aerare. Se construiesc începând de la volume de 0,5 l până la 200 m^3. sunt sterilizabile, iar în timpul procesului de biosinteză se lucrează cu o uşoară suprapresiune pentru menţinerea condiţiilor de asepsie. Amestecul componentelor de reacţie solide, lichide, gazoase se realizează prin agitare utilizând diferite sisteme de construcţie. Sunt prevăzute cu ştuţuri pentru introducerea soluţiilor nutritive, pentru golirea conţinutului, pentru

inoculare şi prelevare de probe, alimentare cu aer şi evacuare a gazelor. Sunt echipate cu dispozitive de termostatare, control pH, O_2, antispumare, etc.

După tipul de operare se deosebesc sisteme omogene şi heterogene. Primele au compoziţie uniformă; celelalte au gradiente de celule sau substrate. La operare continuă în stare staţionară toate microorganismele din sistemul omogen se dezvoltă în aceleaşi condiţii de mediu, care nu se modifică în timp; toate celulele din sistem, în orice moment vor fi deci în aceeaşi stare fiziologică. În sistemul heterogen, microorganismele din diferite zone ale sistemului sunt expuse la diferite condiţii de mediu, vor avea diferite cicluri de viaţă şi vor fi în diferite stări fiziologice. Chiar la operare continuă în stare staţionară, microorganismele care trec printr-un sistem heterogen se comportă ceva asemănător ciclului de dezvoltare din cultura discontinuă.

Trebuie făcută deosebirea între sistemele închise şi deschise. Sistemele închise sunt acelea în care celulele microbiene sunt reţinute în totalitate în sistem, fie printr-o membrană semipermeabilă, prin aderenţă, sau prin recirculare continuă. Sistemele deschise sunt acelea în care celulele trec continuu în efluent. În toate sistemele închise componentele nutritive intră în sistem sau îl părăsesc, fără ca celulele să-l părăsească. Numărul de celule din sistem va continua deci să sporească, până când un factor (altul decât lipsa de componente nutritive), de exemplu lipsa de oxigen, determină oprirea dezvoltării, majoritatea celulelor fiind sortite morţii. În sistemele deschise celulelele părăsesc continuu sistemul cu aceeaşi rată cu care se formează celule noi.

7.3. CINETICA PROCESULUI DE BIOSINTEZĂ-BIOCINETICA

În cadrul proceselor biotehnologice studiul creşterii şi multiplicării microorganismelor producătoare are o importanţă practică deosebită pentru reuşita şi eficienţa tehnologiilor industriale.

Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea celulelor duce la mărirea taliei individului, la toate celelalte organisme unicelulare, ea are ca rezultat creşterea numărului de indivizi. Multiplicarea celulelor bacteriene (procariote) se realizează pe două căi, dintre care una, diviziunea simplă, directă sau binară este practic generală, iar cealaltă, înmugurirea sau ramificarea, este excepţională, fiind caracteristică numai unui număr relativ foarte mic de specii bacteriene. Multiplicarea prin diviziune simplă, tipică speciilor bacteriene atunci când celulele se află în condiţii optime de viaţă, constă în scindarea unui individ, în două celule noi,

care pot fi aproximativ egale (diviziune izomorfă) sau inegale (diviziune heteromorfă). Viteza de multiplicare a bacteriilor este excepțional de mare. Durata unei generații – intervalul de timp dintre două diviziuni succesive – este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia, la aceeași specie în funcție de condițiile de mediu, fiind în general cuprinsă în limitele a 20 – 30 de minute.

Levurile sau drojdiile, taxonomic încadrate în filumul *Eumycetes* (fungi adevărați) se prezintă în mod obișnuit și dominant în formă unicelulară și au o organizare internă de tip eucariot. Ele se înmulțesc în mod obișnuit asexuat prin înmugurire și ocazional prin diviziune simplă sau prin procese sexuale (conjugare) în urma cărora se formează asce cu ascospori.

Mucegaiurile sunt fungi filamentoși cu structură celulară de tip eucariot și se reproduc prin spori.

7.3.1. Dinamica multiplicării populațiilor bacteriene

Procesul evoluează într-o serie de faze succesive.

1) **Faza de latență sau lag** este cuprinsă între momentul introducerii germenului în mediul de cultură (inoculare) și momentul în care celulele acestuia încep să se multiplice.
2) **Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică** este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă (circa 2 ore) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărită, acest ritm devine constant.
3) **Faza staționară maximală** este faza în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp care durează de la câteva ore la câteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriilor la condiții favorabile de mediu.
4) **Faza de declin** corespunde unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile, mergând până la sterilizarea bacteriologică a culturii. La un moment dat, numărul bacteriilor viabile scade în progresie geometrică în raport cu timpul, datorită morții unui număr foarte mare de celule.

7.3.2. Medii de cultură

Un mediu de cultură poate fi definit ca un suport nutritiv sterilizat, care permite dezvoltarea și studiul unui microorganism în afara nișei ecologice naturale. În procesele biotehnologice mediul de cultură are o mare importanță asupra reproductibilității și eficienței tehnologiei respective. Pe

baza diferitelor criterii privind compoziția, consistența, natura ingredientelor, mediile se pot clasifica astfel:

- **după consistență**: medii lichide, solide, semisolide;
- **după tipul respirator al microorganismelor cultivate**: medii pentru microorganisme aerobe sau anaerobe;
- **după compoziție**: medii naturale, care conțin elemente nutritive provenite din țesuturi vegetale, animale și medii sintetice, care conțin numai compuși cu structura chimică cunoscută, dozabili;
- **după scopul și frecvența întrebuințării**: medii de uz curent și medii speciale de izolare care pot fi la rândul lor elective, selective, de îmbogățire, de conservare și de identificare.

În practica biotehnologică se utilizează în mod curent mediile naturale ieftine pe bază de subproduse agroalimentare (șroturi de floarea soarelui, de soia, făină de porumb, tărâțele de grâu, extractul de porumb etc.). acestea au inconvenientul unei standardizări dificile din cauza variabilității compoziției și al poluării cu substanțe nedorite. Se cercetează posibilitatea extinderii mediilor sintetice, perfect reproductibile la scară industrială.

Indiferent de mediul utilizat, pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie asigurate sursele de carbon, azot, fosfor, oligoelemente, factori de creștere.

8. PROCESE ȘI APARATE ÎN OBȚINEREA INDUSTRIALĂ A ENZIMELOR

8.1. PROCESE DE STERILIZARE ÎN INDUSTRIA DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

O primă condiție impusă de procesele de biosinteză industrială a enzimelor este realizarea asepsiei în cadrul fluxului tehnologic.

Această cerință tehnologică se realizează prin pasteurizare sau sterilizare.

Pasteurizarea constă în încălzirea mediilor de cultură la temperaturi sub 100°C, distrugând numai formele vegetative. Tindalizarea este o metodă de sterilizare completă care se realizează prin 2 – 3 pasteurizări la fiecare 24 ore, interval în care mediul de cultură este păstrat la temperatura camerei pentru a permite germinarea tuturor sporilor, adică transformarea lor în forme vegetative care sunt distruse prin pasteurizarea următoare.

Sterilizarea constă în distrugerea sau îndepărtarea microorganismelor (atât formele lor vegetative cât şi sporii) dintr-un spaţiu sau de pe o suprafaţă dată.

Sterilizarea se realizează utilizând agenţi fizici sau chimici.

Sterilizarea prin agenţi fizici se realizează în principal cu ajutorul căldurii uscate sau umede.

8.1.1.Sterilizarea prin căldură uscată.

Această sterilizare este de trei feluri:

Sterilizarea prin flambare şi constă în trecerea obiectului respectiv prin flacără timp de câteva secunde, odată sau de mai multe ori, la intervale scurte. Flambarea se foloseşte pentru sterilizarea suprafeţei exterioare a pipetelor, a gurii eprubetelor şi diferitelor flacoane în care urmează să se însămânţeze sau din care să se recolteze material microbian.

*Sterilizarea prin încălzire la roşu*_constă în menţinerea unui obiect metalic mai mult timp la flacără, până la înroşirea acestuia. Metoda este utilizată pentru sterilizarea firului metalic al ansei de însămânţare, precum şi a spatulelor.

Sterilizarea cu aer cald, se realizează în cuptoare metalice (cuptor Pasteur, etuvă, sterilizator Poupinel etc.), încălzite electric. Prin aer încălzit se sterilizează sticlăria de laborator în prealabil spălată, uscată şi împachetată în hârtie. Temperatura sterilizantă este de 180°C. Prin această metodă se poate steriliza şi aerul de proces care se introduce în bioreactoare.

8.1.2. Sterilizarea prin căldură umedă.

Această sterilizare comportă două metode:

Sterilizarea prin fierbere care se efectuează cu ajutorul sterilizatoarelor electrice sau cu gaz, fiind folosită de regulă pentru instrumentele metalice şi a seringilor. Se recomandă utilizarea apei distilate la care se adaugă borax pentru ridicarea punctului de fierbere şi protejarea instrumentelor împotriva ruginirii.

Fierberea nu este o metodă de sterilizare completă, folosindu-se doar când nu se cer condiţii riguroase de asepsie, iar obiectele astfel tratate nu pot fi întrebuinţate decât imediat după sterilizare.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune este deosebit de eficientă, aburul şi apă fierbinte acţionând prin hidratarea şi coagularea proteinelor microbiene.

BCU "Ion Creangă" LIBRARY

Operaţia se indică pentru sterilizarea mediilor de cultură, a traseelor, aparatelor şi instalaţiilor de biosinteză precum şi a culturilor vechi care nu mai sunt necesare.

8.1.3. Sterilizarea prin raze ultraviolete, catodice, gamma, unde ultrasonice.

În mod curent razele ultraviolete cu lungimea de undă de 2537 Å emise de lămpile germicide sunt utilizate pentru iradierea boxelor sterile.

Sterilizarea prin filtrare se foloseşte pentru sterilizarea substanţelor care se modifică sub acţiunea căldurii (enzime, vitamine, antibiotice etc.). Filtrarea este o metodă mecanică atermică de sterilizare şi constă în trecerea unui fluid prin pereţii poroşi ai unui filtru. Filtrarea nu este o metodă perfectă de sterilizare deoarece microbii cu dimensiuni foarte mici (virusuri, micoplasme, rickettsii) pot traversa pereţii filtrelor.

8.1.4. Sterilizarea prin agenţi chimici.

Pentru sterilizarea prin agenţi chimici se foloseşte curent termenul de dezinfecţie. Această metodă se practică pentru sterilizarea materialelor, obiectelor infectate, încăperilor, instalaţiilor, traseelor, dar nu se va utiliza pentru sterilizarea materialelor destinate cultivării sau manipulării microorganismelor (medii de cultură).

Pentru mărirea eficienţei operaţiilor de sterilizare, instalaţiile pentru biosinteză trebuie să aibă suprafeţe lustruite şi să nu prezinte zone greu sterilizabile. Introducerea diferitelor substanţe în bioreactoare se efectuează utilizând obturatoare termice care asigură asepsia acestei operaţii.

8.2. STERILIZAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ

8.2.1. Teoria generală a sterilizării

Scopul operaţiei de sterilizare este reducerea treptată a numărului de microorganisme viabile din volumul de fluid până la un nivel care nu mai influenţează desfăşurarea ulterioară a procesului. Îndepărtarea microorganismelor se poate efectua după cum s-a mai amintit, prin procedee mecanice (filtrare, sedimentare în câmp centrifugal, flotaţie, distrugere prin abraziune), căldură, agenţi chimici bactericizi, radiaţii X, β sau γ, radiaţii

ultraviolete, energie sonică. Procedeul cel mai intens utilizat este sterilizarea termică; aplicații potențiale au filtrele sterilizante, bactericidele chimice și energia radiantă.

8.2.2. Sterilizarea termică a mediilor

Se poate efectua în sisteme discontinui sau continui. Primul procedeu se poate aplica cu ușurință la medii vâscoase sau formate din suspensii, dar determină o supraexpunere a mediului la temperatură ridicată și consumuri energetice mari. Procedeul continuu are o productivitate ridicată, timpul de expunere la temperatură este mai scăzut, determină consumuri energetice minime, permite automatizarea procesului, este însă greu de aplicat la mediile cu tendință de spumare, cu vâscozitate ridicată sau formate din suspensii. Sterilizarea discontinuă este utilizată mai frecvent întrucât nu necesită echipamente speciale separate, putându-se efectua chiar în reactoarele de biosinteză.

8.2.3. Sterilizarea discontinuă a mediilor de biosinteză

La proiectarea echipamentului industrial de sterilizare discontinuă trebuie cunoscuți – și deci predeterminați experimental – câțiva parametri caracteristici ai sistemului:

a) numărul de contaminanți din mediul care se supune operației de sterilizare (cuprins de obicei între $10^4 - 10^6$ celule/ml);
b) nivelul la care operația de sterilizare se poate considera satisfăcătoare (numărul admis de contaminanți viabili la sfârșitul operației de sterilizare);
c) viteza distrugerii termice a contaminanților.

8.2.4. Sterilizarea continuă a mediilor de biosinteză

Pentru mediile cu vâscozitate redusă și conținut redus de suspensii, utilizarea sterilizării continui permite un control mai ușor al operației, economii de abur și apă de răcire și o mai bună menținere a calității componentelor termolabile ale mediului prin reducerea timpului de contact în zona cu temperatură ridicată.

Realizarea sterilizării până la valoarea finală prescrisă a concentrației contaminanților viabili impune ca fiecare element de volum al fluidului să petreacă în zona de sterilizarea un timp identic.

Echipamentul industrial pentru sterilizarea continuă a mediilor de biosinteză cuprinde schimbătoare de căldură (tubulare, cu plăci etc.) şi injectoare cu abur pentru încălzirea rapidă a mediului.

8.3. AGITAREA, AERAREA ŞI TRANSFERUL DE MASĂ ÎN CAZUL REACTOARELOR DE BIOSINTEZĂ

Solubilitatea oxigenului în apă este de 48 p.p.m. la 14°C, dar întrucât sursa de oxigen este de obicei aerul atmosferic (conţinând numai 20,9% oxigen), această valoare nu este niciodată atinsă. La 14°C, apă saturată cu aer conţine numai 10 p.p.m. oxigen.

Solubilitatea oxigenului scade mult pentru soluţiile saline diluate; un conţinut de 3,4 % săruri dizolvate determină o scădere a concentraţiei oxigenului dizolvat cu 20% din valoarea pentru apă pură. Din acest punct de vedere este mai convenabilă adăugarea treptată de componente nutritive, faţă de utilizarea unor concentraţii iniţiale ridicate.

Rata consumului de oxigen sporeşte rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzând apoi. Valoarea maximă a consumului de O_2 nu coincide de obicei cu momentul atingerii concentraţiilor ridicate de celule de microorganisme iar necesarul de oxigen al culturii reprezintă produsul celor doi parametri. Necesarul de oxigen al culturii este influenţat de mediul de biosinteză utilizat.

Practica procedeelor de biosinteză arată importanţa satisfacerii necesarului de oxigen al microorganismelor; o explicaţie sugestivă este aceea că microorganismele intens aerobe (drojdii, mucegaiuri, bacterii) au fost luate din mediul lor obişnuit de dezvoltare şi puse în condiţii (medii nutritive bogate) în care produc concentraţii ridicate de metaboliţi şi substanţă celulară.

Acestei „aglomerări de microorganisme" trebuie să i se pună la dispoziţie oxigenul necesar, iar din cauza capacităţii reduse a mediilor de biosinteză de a depozita oxigen, furnizarea trebuie să fie continua şi energică. La furnizarea insuficientă de oxigen, producerea de metaboliţi scade; de asemenea în unele situaţii este necesară furnizarea oxigenului în cantităţi strict controlate (activităţile biochimice ale microorganismelor putând fi orientate diferit după concentraţia oxigenului dizolvat din mediul de biosinteză).

Agitarea mecanică

Dispersia O_2 în mediu depinde de:

- densitatea mediului fluid;

- vâscozitatea mediului fluid;
- turația agitatorului;
- diametrul circumferinței descrisă de brațele agitatorului;
- accelerația gravitațională.

Un alt factor care influențează transferul O_2 în mediu este compoziția mediului. Componentele solubile din mediu modifică solubilitatea oxigenului, micşorând gradientul de concentrație care asigură fenomenul de transport. Componentele solubile modifică şi vâscozitatea fazei lichide (mediile care conțin făină de porumb, făină de soia, pectină sau proteine).

Agenții tensioactivi determină o micşorare a coeficienților de transfer prin efecte complexe de micşorare a turbulenței şi de sporire a rezistenței la difuziunea oxigenului.

Un alt factor este concentrația de microorganisme. La concentrații ridicate de microorganisme, vâscozitatea fluidului din reactoarele de biosinteză sporeşte mult (se ating valori de 10000 cP). În aceste condiții disiparea puterii agitatorului scade la distanță mică de zona sa de acțiune directă, iar recircularea conținutului reactorului devine minimă sau se anulează. Scade şi eficiența sistemului de aerare, bulele tinzând să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare. Una din soluțiile utilizate curent este montarea unui al doilea agitator la oarecare înălțime deasupra primului, determinând o mai bună uniformizare a conținutului reactoarelor de biosinteză cu prețul însă al măririi substanțiale a consumului energetic.

8.4. OPERAREA INDUSTRIALĂ A REACTOARELOR DE BIOSINTEZĂ

8.4.1. Obținerea inoculului standardizat

8.4.1.1. *Inocularea mediului de cultură*

Prima operație la dezvoltarea microorganismelor pe mediu de cultură este inocularea.

Pentru obținerea de producții ridicate în mod constant şi asigurarea reproductibilității procesului biotehnologic este necesar să se obțină şi să se asigure un inocul de calitate standardizat care se prepară în laborator, precum şi transferarea acestuia din laborator în producție în condiții care să nu genereze probleme în procesul de producție.

Dacă inoculul este format din celule vegetative aflate în diferite faze ale ciclului biologic (de obicei în faza de post log, staționară) inoculul se

numeşte vegetativ, iar când este constituit din forme de rezistenţă se numeşte sporifer.

Obţinerea şi standardizarea inoculului se diferenţiază în funcţie de tipul de microorganisme.

Bacterii asporogene. În cazul bacteriilor asporogene este indicat să se utilizeze culturi liofilizate sau congelate (–20°C) drept starter. Când nu se dispune de asemenea mijloace se pot utiliza cu bune rezultate substraturile solide pentru menţinerea culturilor perioade de timp mai îndelungate. Culturile germenilor aerobi pot fi păstrate pe medii înclinate în flacoane închise cu filet după incubare şi apoi menţinute la temperaturi apropiate de punctul de îngheţare.

Bacterii sporogene. Modul de preparare în trepte a inoculului acestor microorganisme este identic cu cel al celulelor vegetative. Depozitarea şi standardizarea se realizează mai uşor ţinând seama de rezistenţa şi longevitatea sporilor. Culturile stoc înclinate se repică o dată pe lună sau o dată în decursul mai multor ani, dacă culturile se menţin la –20°C.

Fungi filamentoşi. O diferenţă marcată dintre culturile de fungi (incluzând levurile) şi bacteriile heterotrofe, constă în aceea că ritmul de creştere este considerabil mai mic la primele. Dacă timpul de generaţie al bacteriilor este de 15 – 20 minute, la fungii filamentoşi şi levuri acesta este de cel puţin 2 – 3 ore. Curbele de creştere a culturilor de fungi înregistrează câteva zile. Standardizarea inoculului în scopul obţinerii unor culturi cu proprietăţi reproductibile în fazele avansate de dezvoltare este mult mai greu de realizat pentru culturile fungilor filamentoşi faţă de bacterii sau levuri.

8.4.1.2. *Influenţa proporţiei inoculului în raport cu mediul asupra proceselor biotehnologice*

Calitatea şi cantitatea inoculului joacă un rol important pentru obţinerea unor metaboliţi cu viteze şi randamente dorite de biosinteză. De cele mai multe ori se utilizează o cantitate mare de inocul pentru a determina o declanşare rapidă a dezvoltării culturii concomitent cu reducerea riscului de contaminare. În majoritatea cazurilor este necesar ca dimensiunea inoculului să se situeze între 3 – 10% din volumul total al culturii.

Pentru standardizarea densităţii inoculului se extrage o parte bine determinată (reprezentând raporturi prestabilite între volumul inoculului şi volumul mediului ce va fi inoculat) din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluţie optim pentru obţinerea unei producţii maxime a metabolitului dorit. Acestei culturi i se determină numărul de germeni pe unitatea de volum prin metode directe, indirecte sau i se stabileşte conţinutul în biomasă

(raportată ca substanță uscată la unitatea de volum). Pentru fiecare tehnologie în parte se stabilesc dimensiunile optime ale inoculului, precum și starea fiziologică a microorganismelor, în momentul operației de inoculare, necesară pentru asigurarea productivității și reproductibilității maxime.

Bacterii. Micșorarea fazei de lag când se utilizează un inocul mare se datorează formării de metaboliți intermediari esențiali care trebuie să fie produși de către culturile tinere. Astfel o cultură care provine dintr-un inocul masiv, va acumula o concentrație critică din aceste componente (care pot difuza) în celule (și în mediul fluid de cultură) mai rapid decât o cultură provenind dintr-un inocul mic. Mărimea minimă a inoculului care permite dezvoltarea culturii bacteriene depinde de compoziția substratului. Faza de lag poate fi prelungită la infinit dacă inoculul este mic, în ciuda prezenței celulelor viabile.

Uneori cantitățile mari de inocul determină apariția unui fenomen de autoinhibiție a germinării sporilor bacterieni. Acest efect se datorează sensibilității variabile a celulelor bacteriene față de unii produși metabolici funcție de vârsta și heterogenitatea culturii.

Levuri. Și în cazul levurilor cantitatea de inocul poate influența durata fazei de lag sau stadiile ulterioare de dezvoltare similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

Fungi filamentoși. Importanța standardizării inoculului vegetativ pentru acest grup de organisme este hotărâtoare. Astfel pentru obținerea unui randament maxim de biomasă și a unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul vegetativ format din miceliu aflat în fază de autoliză și nu din miceliu în fază de dezvoltare. Când se utilizează inocul sporifer pot să apară fenomene de autoinhibiție sau autostimulare a germinării sporilor induse de prezența unor substanțe produse în timpul germinării sau în fazele ulterioare.

Mărimea inoculului poate influența și indirect procesul biotehnologic prin intermediul efectelor asupra producerii de substanțe autostimulatoare și autoinhibitoare.

Tehnica de inoculare este o parte importantă a întregului proces biotehnologic. Este crucială etapa trecerii de la cultura de laborator la cea de fabrică. Dificultatea constă în transvazarea unor volume mari de cultură în mod aseptic.

Inocularea în trepte la nivel pilot și industrial ridică o serie de probleme privind transferul rapid și în condiții aseptice a unei cantități mari de inocul. Avantajele utilizării unui inocul mare constă în dezvoltarea rapidă a culturilor ca urmare a reducerii fazei de lag și diminuarea riscului de contaminare.

Tehnica de inoculare joacă un rol important în întregul proces, în special în faza de transfer a culturii de laborator la reactorul de inoculare, apoi la reactorul intermediar şi de regim.

Mai obişnuită şi mai puţin riscantă este transvazarea acestor culturi în condiţii de protecţie totală prin conducte de sticlă, cauciuc, metal sau alte materiale potrivite. Transferul culturii din reactorul de laborator în reactorul de inoculare se efectuează de regulă prin conexiuni rigide.

În cazul proceselor anaerobe se poate utiliza sistemul descris cu deosebirea că în loc de aer pentru realizarea suprapresiunii din reactorul de inoculare se utilizează CO_2 sau un gaz inert. Pentru unele experimentări se utilizează inocularea automată.

8.4.2. Prelevarea în mod steril a probelor din bioreactoare

Pentru controlul şi conducerea procesului biotehnologic este necesară operaţia de prelevare a probelor din bioreactoare în diferite etape de evoluţie.

Prelevarea probelor trebuie să se facă în condiţii perfect sterile pentru a evita eventualele contaminări ce ar compromite procesul.

În prezent se utilizează ventile cu temporizare şi acţionare pneumatică, independent sterilizabile pentru prelevarea aseptică a probelor. Aceste ventile prezintă o serie de avantaje faţă de sistemul clasic asigurând condiţii de perfectă asepsie. De asemenea acest gen de ventil elimină erorile ce pot apare la prelevarea probelor în sistemul clasic prin inactivarea termică a substanţelor biologic active, diluarea sau contaminarea probelor.

8.4.3. Prelucrarea mediilor de biosinteză

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză cuprinde operaţii cunoscute din tehnologia chimică; limpezirea mediilor prin sedimentare în câmp gravitaţional sau centrifugal; recuperarea celulelor microbiene; dezagregarea acestora; concentrarea fazei lichide; alături de acestea se utilizează solvenţi organici sau săruri anorganice; purificări şi concentrări prin ultrafiltrare sau osmoză inversă şi aşa mai departe.

8.4.4. Filtrarea mediilor de biosinteză

Teoria filtrării şi principalele echipamente industriale necesare sunt cunoscute din industria chimică.

Operația de filtrare a mediilor de biosinteză este adeseori facilitată prin utilizarea adjuvanților de filtrare care formează în cursul operației paturi microporoase, micşorând diametrul aparent al porilor (şi implicit mărind eficiența de colectare prin reținerea unor particule de diametru mai scăzut) şi modificând caracteristicile hidrodinamice ale materialului solid (cu care se amestecă) în principal prin îmbunătățirea porozității. Evaluarea calității adjuvanților de filtrare se face după caracteristicile lor de porozitate şi compresibilitate. Utilizarea lor industrială impune obținerea de efecte maxime cu consumuri materiale minime, întrucât adjuvanții sunt scumpi şi reţin prin adsorbție cantități importante de soluție utilă; de cele mai multe ori se utilizează una din următoarele scheme de lucru (sau o combinație de două scheme);

- pe materialul filtrant (pânză de filtru, hârtie etc.) se aplică un strat subțire de material adjuvant (prin filtrarea unei suspensii apoase de adjuvant). Prin patul filtrant astfel format se execută operația de filtrare. Metoda dă rezultate bune la limpezirea soluțiilor diluate;
- adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat; se execută filtrarea recirculând primele porțiuni de filtrat până la limpezirea sa totală. Metoda prezintă avantajul că pachetul filtrant se colmatează lent – de obicei se utilizează în combinație cu primul procedeu.

8.4.5. Dezagregarea celulelor de microorganisme

Punerea în libertate a complexului de substanțe conținute în celulele microbiene, în vederea recuperării componentelor interesante, necesită distrugerea membranei celulare semipermeabile şi a peretelui ei protector. Această operație trebuie efectuată în aşa fel încât modificarea proprietăților utile să fie minimă; se preferă procedeele continui la care valoarea timpului de contact între agentul destructiv şi componenta labilă este redusă şi poate fi exact controlată.

Procedeele de dezagregare ale celulelor microbiene se clasifică după natura agentului de dezagregare utilizat în: procedee mecanice, procedee fizice nemecanice, procedee litice chimice şi enzimatice.

Procedee mecanice de dezagregare celulară. Dezagregarea celulelor se poate efectua în mori coloidale sau în mori vibratoare, menținând un anumit raport de recirculare, până când dezagregarea celulelor microbiene este totală. Menținerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulația unui agent de răcire.

Dezagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice, nemecanice. Dezagregarea celulelor microbiene se poate efectua prin decomprimare rapidă, prin înghețare lentă (datorită sporirii volumului apei la trecerea în stare solidă) sau prin şoc osmotic. Această din urmă metodă are avantajul unei anumite selectivități, determinând trecerea în faza lichidă numai a unora din componentele sistemului.

Un procedeu deosebit de eficace de aplicare a forțelor de forfecare care determină dezintegrarea celulelor de microorganisme este aplicarea de vibrații ultrasonice suspensiei de celule. Dezintegrarea celulelor microbiene este determinată în principal de oscilațiile rapide ale microbulelor şi în secundar de undele de şoc generate de implozie.

Vibrațiile ultrasonice determină, prin dezagregarea celulelor, eliberarea enzimelor caracteristice sistemelor biologice. Primele sunt puse în libertate enzimele citoplasmice, iar ulterior, într-o anumită secvență, enzimele mitocondriale. Principala dificultate în calea aplicării industriale a sistemelor ultrasonice de dezintegrare celulară este legată de îndepărtarea din sistem a căldurii.

Dezagregarea celulelor microbiene prin procedee chimice sau enzimatice. Componentele lipoproteice ale membranei celulare sunt distruse prin acțiunea detergenților cationici sau anionici, sau a solvenților organici, determinând trecerea în faza lichidă a unora din componentele echipamentului enzimatic.

Anumite legături chimice din structura membranelor celulare pot fi scindate prin acțiunea unor preparate enzimatice.

8.4.6. Concentrarea mediilor de biosinteză

Concentrarea mediilor de biosinteză este asemănătoare în principiu cu operația de evaporare practicată în industria chimică. Principalele deosebiri sunt determinate de termolabilitatea lichidelor biologice şi de necesitatea utilizării de echipamente simple cu componente accesibile în vederea menținerii unei igiene perfecte.

Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum care permite efectuarea operației la temperaturi relativ scăzute (25...50°C). Evaporarea în vacuum nu poate fi însă utilizată decât în unități industriale mari datorită cheltuielilor ridicate de investiții şi de întreținere.

La concentrarea moderată (până la 20 – 30%) a substanțelor cu masă moleculară ridicată (proteine, enzime, hormoni) se practică cu succes procedeele de concentrare atermică – ultrafiltrarea şi osmoza inversă.

8.4.6.1. *Concentrarea şi purificarea preparatelor enzimatice prin ultrafiltrare şi osmoză inversă*

Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluţii datorită diferenţelor de volum molecular cu ajutorul unei membrane.

Acumularea de substanţă în zona membranei semipermeabile constituie fenomenul denumit polarizare de concentraţie determinând uneori precipitarea unui gel care măreşte rezistenţa la trecerea fluxului de fluid.

8.4.6.2. *Utilizările ultrafiltrării în industria preparatelor enzimatice*

a). **Procese continui de biosinteză cu îndepărtarea enzimelor extracelulare.** Echipamentele de ultrafiltrare permit izolarea şi purificarea preparatelor enzimatice de origine microbiană simultan cu producerea lor în reactoarele de biosinteză.

b). **Reacţii enzimatice în sisteme continui.** Utilizarea celulei de ultrafiltrare ca reactor enzimatic se efectuează în modul următor: reactorul propriu-zis este alimentat continuu cu soluţia sau suspensia de substrat; amestecul de reacţie compus din enzimă, substratul nereacţionat, complexul enzimă – substrat şi produsele de reacţie, se recirculă continuu.

c). **Purificarea şi concentrarea preparatelor enzimatice brute.** Concentrarea şi purificarea preparatelor enzimatice brute (şi a altor preparate biologice) reprezintă o operaţie tehnică complexă şi complicată. Concentrarea sub vid nu poate fi întotdeauna utilizată datorită interacţiunilor fizico-chimice care produc modificări ale caracteristicilor biologice; mai mult, operaţia de concentrare sub vid este o mare consumatoare de energie (pompe şi agent termic). Alte tehnici cunoscute (cristalizarea, precipitarea cu săruri sau cu solvenţi, ultracentrifugarea, separarea cromatografică) sunt costisitoare şi nu întotdeauna eficiente. Ultrafiltrarea constituie o metodă care înlătură unele din dezavantajele procedeelor clasice. Purificarea se explică prin trecerea în permeat a unor substanţe de balast, de natură proteică, dar cu volum molecular inferior enzimei.

8.4.6.3. *Precipitarea preparatelor enzimatice*

Metoda, devenită clasică de obţinere a preparatelor enzimatice în stare solidă este precipitarea lor prin adăugare de săruri anorganice sau de solvenţi organici miscibili cu apa, urmată de separarea celor două faze (sedimentare în câmp gravitaţional, centrifugal, filtrare).

La precipitarea unei enzime dintr-un amestec de proteine, activitatea enzimatică a supernatantului constituie o indicaţie asupra solubilităţii

proteinei enzimatice şi poate fi utilizată la descrierea efectului diferiţilor factori asupra operaţiei de precipitare. Concentraţia de proteină enzimatică este în aceste cazuri mult mai mică decât solubilitatea ei maximă. La adăugarea agentului de precipitare solubilitatea tuturor proteinelor începe să scadă (proteinele de balast, prezente în concentraţii mari, precipită şi pot fi separate încă din această fază); atunci când solubilitatea a scăzut considerabil faţă de valoarea iniţială, solubilitatea proteinei enzimatice scade sub concentraţia ei iniţială determinând începerea precipitării. La adăugarea agentului de precipitare în stare solidă, punctul exact în care începe precipitarea este mai greu de sesizat, procedeul de realizare practică a contactului enzimă-agent salin influenţând starea de echilibru.

Privind influenţa concentraţiei iniţiale a proteinei enzimatice asupra curbei de solubilitate, precipitarea enzimei se produce la concentraţii cu atât mai mici de agent salin, cu cât concentraţia iniţială a proteinei enzimatice este mai mare.

Evident, alegerea unei anumite variante de precipitare este determinată de considerente tehnico-economice (randament de precipitare, posibilităţi de recuperare a agentului de precipitare, accesibilitatea acestuia, comoditatea separării lichid-solid, etc.).

8.5. TEHNOLOGII ENZIMATICE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

8.5.1.Tehnologii enzimatice în industria amidonului

8.5.1.1. *Nomenclatură şi definiţii în industria hidrolizatelor de amidon.*

Sirop de glucoză (Glucose Syrup) se referă la un sirop vâscos, necristalizat, obţinut prin hidroliza parţială a amidonului (DE = 32....40).

Glucoză solidă sau glucoza tehnică este un produs sub formă solidă având un conţinut de dextroză cuprins între 60 – 70%.

Zahăr total (Total Sugar), produs prin hidroliza totală a amidonului, urmată de o formă de solidificare (conţine 98 – 99% glucoză).

Hidrol – ape muna de la cristalizarea glucozei.

Izosirop (High Fructose Syrup): produs obţinut prin izomerizarea enzimatică a glucozei la fructoză. Conţine ≈ 52% glucoză, ≈ 42% fructoză, ≈ 6% oligozaharide.

Zahărul invert (Invert Sugar): sirop sau pastă care conţine 50% monozaharide şi = 40% zaharoză.

Dextroză, în industrie considerată sinonim cu glucoza. Anhidru sau monohidrat este denumit dextroză, zahărul solid obținut prin hidroliza completă a amidonului și succesiva cristalizare a soluției suprasaturate (DE > 98).

Conversie, indică operația de hidroliză acidă sau enzimatică a amidonului.

Echivalent dextroză (Dextrose Equivalent, DE): reprezintă cantitatea de zaharuri reducătoare exprimate ca D-glucoză raportată ca procent din cantitatea totală de solide:

$$DE\% = \frac{\text{Zaharuri reducătoare (exprimate ca dextroză)}}{\text{substanța uscată totală}} \times 100$$

Siropuri de conversie înaltă (High Conversion Syrups, High Maltose Syrups): siropuri obținute prin conversie enzimatică, raportul diferitelor fracțiuni de zaharuri putând fi variat, au aromă plăcută și sunt stabile la temperaturi de depozitare.

8.5.1.2. *Fabricarea dextrinei pe cale enzimatică*

Dextrina este un produs macromolecular intermediar între amidon și glucoză obținut prin degradarea amidonului, fiind constituită dintr-un amestec de componenți proveniți din scindarea lanțurilor de amidon.

Scindarea polimerului de amidon se poate realiza prin procese de hidroliză parțială cu acizi sau enzime.

În funcție de reacția pe care o dă cu iodul, dextrinele se pot împărți astfel: amilodextrine, eritrodextrine, acrodextrine și maltodextrine.

În principiu suspensia de amidon se dextrinizează în flux continuu cu alfa-amilază bacteriană într-un dispozitiv injector după care soluția de dextrină se poate usca prin atomizare rezultând un produs de culoare albă, pulverulent și având caracteristici superioare.

Utilizându-se preparate enzimatice cu efect selectiv termostabile se pot obține, în flux continuu și timpi de reacție reduși, soluții omogene de dextrină de diferite vâscozități și cu conținut mic de zaharuri reducătoare.

8.5.1.3. *Fabricarea maltodextrinelor*

Maltodextrina este un produs obținut prin solubilizarea și dextrinizarea amidonului din cereale sau cartofi cu alfa-amilază bacteriană până la un DE 10 – 20, urmată de uscare prin atomizare. Produsul se utilizează ca

BCU IAȘI - UNIVERSITY LIBRARY

ingredient la fabricarea produselor dietetice şi pentru copii, fiind o formă de amidon uşor asimilabilă.

Maltodextrinele se folosesc şi în industria produselor zaharoase, de cofetărie, pentru prepararea cremelor, pudingurilor, etc.

În procedeul unistadial suspensiei de amidon cu pH 6 – 6,5 şi 30 – 40% s.u. i se adaugă enzima Thermamyi 60 L (1,2 kg enzimă/t amidon s.u.) după care amestecul este trecut la 105°C printr-un injector (jet-cooker) pentru lichefiere, într-un tanc cu agitare unde continuă procesul de dextrinizare 60 – 120 de minute la 95°C.

8.5.1.4. *Fabricarea siropului cu conţinut ridicat de maltoză şi a siropurilor de conversie înaltă*

Producerea siropurilor de cereale prin conversie acidă până la DE 40 urmată de conversie enzimatică cu amilază fungică a fost introdusă în SUA din 1940. Conversiile cu acizi au loc până la DE 40 – 50, iar conversia enzimatică până la DE 60 – 70.

Compoziţia siropului de conversie înaltă cu DE 63 este %: dextroză 37,5; maltoză 34,2; tri- şi tetrazaharide 16,1; dextrine 12,2.

Accesibilitatea enzimelor fungice cu raport mare de alfa-amilază faţă de activitatea glucoamilazică permite fabricarea industrială a siropurilor de cereale. În prezent se produc siropuri cu DE 63, dar cu o concentraţie mai mică de dextroză şi dextrine şi o concentraţie mai mare de maltoză. Aceste siropuri au o aromă plăcută şi o vâscozitate redusă datorită conţinutului redus de dextrine. Se poate de asemenea modifica procesul acid-enzimă în aşa fel încât plecând de la un sirop cu DE 20, conversia enzimatică să ducă la un sirop cu DE 26 – 32 şi având deci un conţinut ridicat în dextrine. Pentru stabilizarea împotriva formării de suspensii şi turbiditate, aceste siropuri trebuie concentrate înainte de filtrare.

Suspensia de amidon având o concentraţie de 30 – 45% s.u. se lichefiază şi dextrinizează după procedeul acid sau enzimatic, până la valori ale DE-ului de 14 – 42. Acest hidrolizat constituie substratul pentru alfa-amilaza fungică Fungamyl 800 L şi amiloglucozidaza fungică AMG 150 L, care vor acţiona timp de 40 – 42 h rezultând în final un sirop bogat în maltoză. Siropul se purifică şi se concentrează.

8.5.1.5. *Fabricarea glucozei pe cale enzimatică*

În industrie glucoza poartă denumirea de dextroză.

Hidroliza amidonului la zaharuri cu ajutorul acizilor şi enzimelor a fost cunoscută de la începutul secolului al XIX-lea, prima fabrică de

producere a siropurilor prin conversie acidă fiind construită în Franța în 1814. În prezent în țările dezvoltate, prin procedeul enzimatic se produc 1,2 milioane tone de glucoză, din care mai mult de 50% în S.U.A. Tehnologia obținerii glucozei pe cale enzimatică și-a făcut cu ușurință loc din cauza greutăților pe care le comportă sistemele de conversie cu acizi.

Transformarea amidonului în glucoză prin procedeele curente cuprinde două faze distincte: solubilizarea (transformarea amidonului într-o formă solubilă) și hidroliza (zaharificarea propriu-zisă) care împinge procesul de degradare până la molecula de glucoză.

Din acest punct de vedere, procedeele de hidroliză se pot clasifica în:

- procedeul acid, cele două faze utilizează acizi minerali;
- procedeul acid-enzimă: solubilizarea, lichefierea amidonului se fac cu acid iar zaharificarea cu enzima amiloglucozidaza fungică;
- procedeul enzimă-enzimă: lichefierea suspensiei de amidon se face cu alfaamilază bacteriană iar zaharificarea cu amiloglucozidază fungică.

Lichefierea și zaharificarea enzimatică dau practic conversii cantitative ale amidonului la glucoză.

Procedeele enzimatice se utilizează în prezent la fabricarea hidrolizatelor de amidon pentru obținerea unor sortimente cu diverse proporții între principalii componenți: glucoza, fructoza, maltoza, dextrine.

Astfel se obțin sortimente ca: dextroza cristalizată monohidrat, dextroza cristalizată anhidră, zahăr total, siropuri de conversie înaltă, maltodextrine, dextrină, izosiropuri.

Vom descrie în continuare tehnologiile de conversie enzimatică pentru obținerea acestor sortimente.

Suspensia de amidon cu o concentrație de 30 – 45% substanță uscată se supune unei hidrolize puțin intense, la pH = 6,5 și 85°C utilizând alfa-amilază bacteriană. Pentru dextrinizarea suspensiilor de amidon se utilizează instalații de lichefiere în flux continuu. Suspensia de amidon în care s-a introdus enzima, alfaamilaza este încălzită prin amestecare cu abur până la temperatura de gelifiere în dispozitive de tip injector (jet-cooker), moment în care enzima acționează aproape instantaneu producând fluidificarea gelului. Dextrinizarea este o fază foarte importantă la fabricarea dextrozei pe cale enzimatică. Atunci când dextrinizarea durează mult, lanțurile de amiloză parțial hidrolizate se pot asocia prin legături de hidrogen formând granule de amidon retrogradat. Granulele de amidon retrogradat sunt foarte greu hidrolizabile de amiloglucozidază în timpul fazei de zaharificare producând fenomene nedorite ca: turbiditate și filtrare dificilă a hidrolizatelor.

Acestea se pot evita prin încălzirea hidrolizatelor la 120....135°C pentru degradarea termică a granulelor de amidon şi coagularea termică a proteinelor în special la amidonurile de porumb.

Gradul optim de dextrinizare este de circa 10 – 13 DE. O dextrinizare avansată este defavorabilă zaharificării cu amiloglucozidază, deoarece enzima are o afinitate scăzută faţă de dextrinele cu grad de polimerizare mic, pe când o hidroliză prea limitată duce la formarea de granule de amidon retrogradat.

După lichefiere-dextrinizare soluţia se răceşte la 60°C, se ajustează pH-ul la 4 – 4,5 şi se adaugă amiloglucozidază fungică pentru zaharificare. Procesul de zaharificare continuă 48 – 72 ore până când valoarea echivalentului dextroză (DE) nu mai creşte. În ultimul timp se utilizează tot mai mult zaharificarea în flux continuu utilizând glucoamilaza imobilizată. Hidrolizatul se tratează termic 15 min. la 120°C, se răceşte şi se purifică prin filtrare cu kiselgur, decolorare cu cărbune activ, demineralizare prin schimb ionic. Produsul purificat şi supus concentrării sub vid este trecut la faza de cristalizare. Dextroza cristalizată anhidră se obţine prin procedeul enzimatic (spre deosebire de cel acid) direct din hidrolizatele enzimatice şi nu plecând de la dextroza cristalizată monohidrat.

Aplicarea procedeelor enzimatice la fabricarea glucozei are ca rezultat o serie de avantaje în comparaţie cu procedeul acid. Datorită gradului avansat de zaharificare şi purităţii mari, se reduce timpul de cristalizare şi se elimină hidrolul.

În prezent pentru fabricarea dextrozei se utilizează procedee tehnologice în flux continuu utilizând hidroliza dublu enzimatică. Hidroliza continuă se efectuează în instalaţii industriale.

8.5.1.6. *Fabricarea zahărului total*

Urmare avantajului de a se obţine prin conversie enzimatică un grad avansat de zaharificare şi puritate se creează posibilitatea obţinerii unui produs în stare pulverulentă, fără cristalizare, prin atomizare. Acest produs este denumit *zahăr total*.

Suspensia de amidon 30 – 40% s.u. se dextrinizează cu Thermamyl 60 L până la DE 10 – 20. acest hidrolizat constituie substratul asupra căruia va acţiona amiloglucozidaza fungică AMG 150 L (1,5 l/t amidon s.u.) într-un tanc cu agitare la pH 4,5,la 60°C timp de 48 ore. După terminarea zaharificării DE hidrolizatului este de 97 – 98, iar conţinutul în D-glucoză de 95 – 96%. Siropul obţinut se purifică şi se usucă prin atomizare.

8.5.1.7. *Tehnologia fabricării izosiropului HFCS – High Fructose Corn Syrup*

Puterea de îndulcire a siropului izomerizat, considerabil mai mare față de acea a siropului de glucoză, a fost încă de mult motivul străduințelor de a izomeriza glucoza la fructoză.

Procedeele actuale de izomerizare enzimatică cu glucozizomerază cuprind fazele: siropul de glucoză cu DE ridicat (>92) se decolorează pe cărbune activ, se deionizează prin schimb ionic, se degazează, apoi se adaugă stabilizatori săruri de Mg şi Co. Izomerizarea cu glucozizomerază imobilizată se face la 60...70°C după ajustarea pH-ului la valori cuprinse între 6,6 – 8,5, pH-ul exact fiind specific pentru enzima utilizată. pH-ul alcalin, durata de reacție şi temperaturile ridicate conduc la formarea psicozei, manozei, sorbozei şi a compuşilor acizi. Formarea acestora este paralelă apariției substanțelor colorate. Se va opta pentru enzima al cărei pH optim este cel mai coborât, pH-ul mai scăzut cu numai 0,5 unități determină cheltuieli de decolorare mai mici şi pierderi reduse de zaharuri. La un consum de cărbune activ de 0,2% pentru decolorare, formarea de produşi colorați în timpul izomerizării nu trebuie să depăşească circa $25 \cdot 10^6$ C.I.R.F. (Corn industries research fondation units). La un pH de lucru de 8,5 timpul de contact critic este de 3 ore, în timp ce pentru enzima care izomerizează optim la pH = 8,0, timpul de contact permis poate fi dublu. Cea mai largă utilizare a căpătat-o procedeul de izomerizare continuă în reactoare de tip coloană.

Înainte de a începe, calculele pentru dimensionarea coloanelor trebuie să se decidă ce enzimă se va utiliza, deoarece puterea de gonflare, greutatea specifică, stabilitatea la presiune şi activitatea specifică sunt specifice pentru fiecare preparat enzimatic.

8.5.2. Tehnologii enzimatice în industria spirtului şi a berii

8.5.2.1. *Fabricarea spirtului utilizând preparate enzimatice*

Aproape 75% din producția mondială de etanol industrial este obținută prin fermentație.

Obținerea spirtului din materii prime amidonoase necesită hidroliza amidonului la zaharuri fermentescibile. Zaharificarea în procedeul clasic se realizează cu lapte de slad, obținut prin germinarea orzului.

Tehnologiile moderne utilizează în cadrul operației de zaharificare preparate enzimatice microbiene, alfaamilaza bacteriană pentru dextrinizarea amidonului şi amiloglucozidaza fungică pentru zaharificarea dextrinelor.

Datorită termostabilității sale ridicate alfaamilaza bacteriană permite utilizarea unor plămezi concentrate, iar zaharificarea cu amiloglucozidază are loc simultan cu fermentarea.

Viteza şi gradul de fermentare a plămezilor amidonoase zaharificate cu amiloglucozidază sunt funcție de concentrația enzimei şi de starea amidonului.

Tratarea preliminară a amidonului cu alfaamilază îmbunătățeşte atacul amiloglucozidazei şi permite micşorarea consumului de amiloglucozidază.

Durata fermentării în cazul zaharificării plămezilor amidonoase cu amestec de alfaamilază şi amiloglucozidază se poate reduce de la 72 h la 36 – 24 h utilizând doze crescânde de enzime.

Preparatele enzimatice amilolitice microbiene sunt preferate pentru zaharificarea plămezilor datorită multiplelor avantaje pe care le oferă:

- enzimele sunt agenți naturali de zaharificare acționând în condiții blânde de temperatură, pH, presiune;
- sunt economice, iar depozitarea şi utilizarea lor sunt simple şi necesită un volum redus de muncă;
- înlocuirea sladului determină creşterea producției, deoarece activitatea preparatelor enzimatice este standardizată asigurând o înaltă reproductibilitate, eliminându-se randamentele scăzute în alcool datorită activității enzimatice fluctuante a sladului, permițând în acelaşi timp disponibilizarea unor cantități de orz;
- randamentele în alcool etilic sunt egale cu acelea care se obțin cu slad, iar dacă tehnologia este optimizată randamentele pot fi mai bune (cu circa 1%);
- utilizarea preparatelor enzimatice permite menținerea unor fermentații fără contaminări deoarece se pot folosi plămezi acidifiate (pH 4,5), iar fermentarea hidraților de carbon se face mai complet şi mai rapid;
- preparatele enzimatice nu au efecte negative asupra posibilităților de utilizare a deşeurilor ca furaje sau asupra calității şi gustului distilatelor;
- se pot utiliza în orice unitate fără investiții suplimentare deosebite.

O cerință importantă a tehnologiilor actuale este aceea de a se utiliza procese continui de mare randament. Realizarea fermentației continue a plămezilor de materii prime amidonoase este mult mai dificilă decât în cazul fermentării melasei, rezolvarea problemei fiind strâns legată de combaterea infecțiilor care apar în timpul procesului.

O problemă majoră a proceselor convenţionale de fabricare a alcoolului este inhibiţia prin produsul final etanolul. La concentraţii ale etanolului de 7 – 10%, viteza specifică de producere a alcoolului şi viteza specifică de creştere a drojdiei scad simţitor.

Pentru a menţine concentraţia de etanol la un nivel optim, soluţiile concentrate de zaharuri trebuie diluate la 10 – 20%.

Când se optează pentru lucrul cu procedeul vacuferm, după sterilizarea mediului de cultură pe bază de glucoză se aduce temperatura la 35°C şi se inoculează. În timpul dezvoltării discontinue (12 – 16 ore) se aerează cu un debit de 0,17 V/V/minut. La terminarea dezvoltării, discontinue se opreşte aerarea şi se barbotează în fermentator 0,12 V/V/minut oxigen. Presiunea din fermentator se reduce treptat până la 50 mm Hg, presiune la care punctul de fierbere al mediului fermentat conţinând 1% etanol este de 35°C, corespunzând optimului la care drojdia fermentează zaharurile.

pH-ul mediului fermentat în procedeul vacuferm este de 4,0 – 3,5 menţinut prin capacitatea de autotamponare a plămezii.

8.5.2.2. *Fabricarea berii utilizând preparate enzimatice*

La fabricarea berii, malţul are ponderea cea mai mare în preţul de cost. Preţul malţului creşte de circa două ori faţă de orzul din care se fabrică datorită pierderilor de malţificare (25% din greutatea materiei prime luate în lucru), cheltuielilor de fabricaţie, manoperă, utilităţi, amortismente.

Pentru utilizarea cerealelor nemalţificate în procent ridicat faţă de malţ (50 – 75%) se recomandă folosirea preparatelor enzimatice microbiene, înregistrându-se astfel şi o scădere a preţului de cost al berii.

În acest scop se folosesc următoarele preparate enzimatice de origine microbiană: alfa-amilază bacteriană, protează bacteriană, beta-glucanaza bacteriană, alfa-amilaza fungică, amiloglucozidaza fungică.

Complexul enzimatic alfa-amilază-protează-betaglucanază de origine bacteriană poate fi obţinut utilizând un singur microorganism, spre exemplu tulpini selecţionate de B. subtilis, sau două microorganisme, unul producând cu precădere alfa-amilază iar celălalt protează.

Alfa-amilaza din preparatul enzimatic dextrinizează rapid amidonul în timpul brasajului, protează participă la degradarea hidrolitică a substanţelor proteice, iar beta-glucanaza descompune beta-glucanul reducând în acest fel vâscozitatea mustului.

Succesul utilizării preparatelor enzimatice microbiene la fabricarea berii cu un procent ridicat de cereale nemalţificate necesită ca prin hidroliza cu preparate enzimatice a cerealelor nemalţificate să se obţină un must de bere a cărui compoziţie în hidraţi de carbon, compuşi cu azot şi alte componente să fie identică cu compoziţia mustului obţinut din malţ.

8.5.3. Utilizarea carbohidraților pentru fabricarea biomasei și etanolului. Bioenergetica

Tehnologiile bazate pe conversia enzimatică a carbohidraților la etanol oferă posibilitatea obținerii unor biocarburanți valoroși.

Etanolul suscită un interes deosebit datorită faptului că poate fi utilizat direct sau în amestec cu benzina (gazohol) la motoarele cu ardere internă. Folosit la un motor modificat, etanolul furnizează cu 18% mai multă energie la litru decât petrolul, fiind totodată mult mai puțin poluant.

8.5.3.1. *Prelucrarea enzimatică a celulozelor*

În momentul de față există mai multe posibilități de valorificare a rezervelor celulozice și anume:

- obținerea complexului enzimatic celulozolitic pentru hidroliza celulozei la zaharuri simple asimilabile (glucoză);
- utilizarea enzimelor celulozolitice în furajarea animalelor pentru sporirea digestibilității componentelor grosiere ale hranei;
- obținerea de proteine cu valoare biologică ridicată;
- obținerea de metan prin transformare microbiană anaerobă.

Randamentul de transformare al celulozei este diferit în funcție de materia primă. Aceasta se explică atât prin gradul diferit de cristalizare a diverselor celuloze, care variază, de exemplu, între 29% la știuleții de porumb până la 73% la linterul de bumbac cât și prin compoziție chimică diferită.

Celuloza este expusă acțiunii unui filtrat cu activitate enzimatică rezultat prin cultivarea fungului Trichoderma viride. Hidroliza are loc la temperatura de 50°C într-un reactor, astfel încât, circa 30% din conținutul acestuia o reprezintă celuloza și 0,1% produsul enzimatic. După realizarea hidrolizei produsul se supune ultrafiltrării, glucoza obținută fiind eliminată odată cu dializatul sub formă de sirop 15% s.u., în timp ce, celuloza netransformată este reintrodusă în reactor. În condiții practice, folosind o suspensie de 15% hârtie de ziar la o durată de hidroliză de 48 h, în reactor se obține o soluție de 10% glucoză corespunzător unui grad de zaharificare de 60%.

Siropul de glucoză obținut poate fi utilizat pentru obținerea unui alt suport energetic, pentru producerea de furaje sau ca sursă de carbon pentru alte procese de biosinteză și în special pentru obținerea de acizi organici și produse farmaceutice.

În ultimul timp se face resimțită o tot mai acută lipsă de proteine echilibratre de tip animal, ceea ce a condus la intensificarea cercetărilor

asupra obținerii de biomase furajere sau alimentare. Se caută obținerea de microorganisme polifage susceptibile de a metaboliza produse agricole și deșeuri din industria agroalimentară în vederea producerii de aminoacizi și de biomase bogate în proteine cu înaltă valoare biologică.

8.5.3.2. *Bioconversia altor carbohidrați în biomasă și etanol*

Unele deșeuri de proveniență industrială ca apele reziduale de la fabricile de amidon, zerul etc. sunt bogate în carbohidrați poluând totodată mediul înconjurător. În scopul obținerii de biomasă din acești carbohidrați s-au elaborat diferite tehnologii.

8.5.3.3. *Utilizarea zerurilor pentru fabricarea proteinelor și etanolului*

Lactoza, principalul constituent al zerului de la fabricarea brânzeturilor, poate fi transformată în proteină de înaltă calitate și etanol, prin bioconversie.

O tulpină selecționată de Saccharomyces fragilis este dezvoltată pe zer acid sau dulce într-o instalație industrială cu funcționare continuă. Procesul prezintă numeroase avantaje datorită faptului că se desfășoară la un pH coborât, utilizând un inocul masiv cu densitate celulară ridicată, eliminând necesitatea unor tehnici și utilaje aseptice. Aerarea este moderată, controlul spumării este simplu, termostatarea se realizează cu un consum redus de apă de răcire, mediul de cultură are o compoziție simplă, iar lipsa substanțelor toxice din mediu simplifică recuperarea produsului. Procedeul este complet nepoluant, neavând efluenți. Transformarea lactozei în biomasă este eficientă fiind în domeniul 42 – 52% în condiții aseptice de lucru.

În procesul discontinuu la un inocul de 10% având o densitate celulară de 1×10^9 celule/ml, întreaga cantitate de lactoză este consumată în decurs de 8 ore, concomitent cu sporirea densității celulare de 10 – 20 ori. Timpul de generație este de 2 ore.

Procesul continuu se amorsează în momentul când numărul de celule viabile atinge 1×10^9 celule/ml, iar concentrația lactozei scade la 0,50 – 0,75%.

Zerul astfel transformat se poate utiliza ca ingredient alimentar numai prin simpla concentrare sau atomizare a mediului după dezvoltarea levurii. Conținutul în proteină brută al produsului este cuprins între 35 și 55%, iar raportul de eficiență proteică (PER) este de 69 – 91 față de cazeina A.N.R.C.

8.5.4. Preparate enzimatice pectolitice

Substanțele pectice sunt constituenți fiziologici universali ai vegetalelor. Printre substanțele pectice se disting: acizii pectinici, acizii pectici şi protopectinele.

Acizii pectinici. Sunt heteropolizaharide constituite în principal din câteva zeci sau sute de molecule de acizi D-galacturonici, în majoritate sub formă de ester metilic.

Acizii pectici. Sunt acizi poligalacturonici neesterificați insolubili în apă.

Protopectinele. Insolubile în apă stau la originea substanțelor pectice, eliberând prin hidroliză pectine.

Enzimele care acționează asupra substanțelor pectice se pot încadra în două grupe: enzime saponifiante şi enzime depolimerizante.

8.5.4.1. *Biosinteza şi utilizările preparatelor enzimatice pectolitice*

Biosinteza enzimelor pectolitice este puternic indusă de prezența pectinei în mediul de cultură. Unele microorganisme elaborează constitutiv enzime pectolitice.

Preparatele enzimatice pectolitice comerciale se obțin prin cultivarea tulpinilor selecționate de microorganisme pe medii de cultură formate din tărâțe de grâu, tăiței de sfeclă de zahăr, morcovi, melasă, tescovină de mere, etc.

După dezvoltarea microorganismului şi biosinteza enzimelor mediile de cultură sunt prelucrate după tehnicile cunoscute obținându-se preparate enzimatice pectolitice purificate prezentate sub formă de lichid concentrat sau sub formă solidă.

Preparatele enzimatice pectolitice de origină microbiană sunt utilizate de mult timp în industria sucurilor de fructe, conservelor de legume, vinurilor, produselor zaharoase, etc.

8.5.4.2. *Utilizarea enzimelor pectolitice în industria sucurilor de fructe*

Preparatele enzimatice pectolitice sunt utilizate în industria sucurilor de fructe pentru:

- macerarea pulpelor de fructe;
- ameliorarea extracției;
- clarificarea sucurilor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tratamentul fructelor

Pentru tratamentul pulpelor de fructe sunt utilizate două tipuri de enzime după scopul urmărit.

Enzime pectolitice de extracţie: acestea sunt amestecate cu pulpele fructelor ca: zmeură, coacăze, struguri, mere, citrice etc., pentru a dezagrega pereţii celulari şi a uşura extracţia sucului la presare.

Enzime pectolitice de maturare: sunt utilizate pentru a degrada numai substanţele pectice ale lamelor mijlocii care asigură legătura dintre celule. Astfel de preparate enzimatice sunt întrebuinţate în special pentru fabricarea piureurilor fine când celulele parenchimatoase trebuie doar separate fără a le distruge peretele celular.

Tratamentul sucului de fructe

Scăderea vâscozităţii care uşurează filtrarea sucurilor de fructe este atribuită scindării lanţurilor poligalacturonice de către enzimele pectolitice cunoscute sub denumirea de enzime filtrante.

Pentru sucurile de struguri flocularea coloizilor intervine atunci când scăderea vâscozităţii relative a sucului este de ordinul a 90 – 95%. O astfel de diminuare a vâscozităţii poate corespunde unei hidrolize de numai 5% a legăturilor ozidice α–1,4 din interiorul lanţurilor poligalacturonice.

8.5.4.3. *Utilizarea preparatelor enzimatice pectolitice în industria vinurilor*

Utilizarea preparatelor enzimatice pectolitice la prelucrarea strugurilor prezintă o serie de avantaje din care citãm:

- permite scurtarea timpului de presare şi mărirea cantităţii de must, uşurând filtrarea şi limpezirea acestuia, precum şi a vinului sporind viteza de prelucrare a strugurilor şi deci capacitatea instalaţiilor;
- grăbeşte fermentarea mustului;
- măreşte extracţia de culoare la prepararea vinurilor roşii precum şi a unor substanţe de valoare conţinute în structurile bobului şi rahisului de strugure.

8.5.5. Preparate enzimatice proteolitice (proteaze)

Enzimele proteolitice sau proteazele fac parte din clasa hidrolazelor. Ele sunt reprezentate de un număr mare de enzime având capacitatea de a cataliza scindarea legăturilor –CO–NH–peptidice din moleculele proteinelor şi ale produşilor lor de degradare,.

Industria hidrolizatelor proteice

Industria alimentară utilizează hidrolizatele diferitelor substanţe proteice pentru fabricarea prafului de supe, a unor produse de carne, dresingurilor, băuturilor proteinizate etc.

În medicină hidrolizatele proteice sunt utilizate ca hrană parenterală sau per os în tratarea diferitelor maladii.

În zootehnie hidrolizatele proteice obţinute pe cale enzimatice se utilizează cu succes în formula unor înlocuitori de lapte pentru creşterea vitelor.

Industria tăbăcăriei şi blănurilor

Preparatele enzimatice proteolitice bacteriene sau fungice se utilizează cu mare eficienţă pentru depilarea pieilor, obţinându-se produse de calitate în acelaşi timp cu recuperarea lânei, articol valoros în cazul prelucrării pieilor de ovine.

Industria detergenţilor

Detergenţii pe bază de preparate enzimatice au apărut pe piaţă încă din 1913. însă numai din 1963 enzimele ocupă un loc egal cu celelalte ingrediente binecunoscute la fabricarea detergenţilor ca: tripolifosfatul de sodiu, carboximetilceluloza şi perboratul.

Amploarea înregistrată în domeniul fabricării detergenţilor cu enzime se datorează utilizării unor proteaze, care în contrast cu preparatele triptice utilizate anterior sunt stabile şi active în condiţii de lucru mai energice. Acestea sunt caracterizate prin pH cuprins între valorile 9 – 10, temperatură relativ ridicată şi un conţinut important de substanţe care reacţionează cu calciul.

Utilizând detergenţii cu enzime se obţine o economie de materiale de spălare, o eficacitate sporită de îndepărtare a murdăriei şi o mărire a durabilităţii articolelor supuse curăţirii.

În prezent s-au elaborat tehnologii de fabricare a microcapsulelor care conţin enzime detergent. Microcapsulele conţinând protează, amilază, lipază sau unul din amestecurile acestora sunt formate dintr-o peliculă de sare anorganică şi un strat care conţine substanţa liant. În acest mod enzimele nu sunt supuse acţiunii altor componenţi ai detergentului şi nici umidităţii din atmosferă, până în momentul când capsula ajunge în apă. În stare uscată activitatea enzimelor se păstrează timp îndelungat.

Utilizarea proteazelor în panificaţie

Datorită utilizării moderne a făinurilor cu conţinut ridicat de proteine, preparatele proteolitice au un câmp larg de utilizare la fabricarea biscuiţilor şi pâinii.

În cursul fermentării aluatului factorul care devine cel mai important este pH-ul. În timpul acestei perioade are loc scăderea pH-ului datorită formării acizilor lactici şi acetic în majoritatea cazurilor. Aşa cum am arătat anterior, proteazele au pH-uri optime de activitate diferite: 5,5 pentru proteazele fungice şi în jur de 8,5 pentru proteazele bacteriene. Rezultă că proteazele fungice au o acţiune mai puternică în cursul fermentaţiei, în timp ce proteazele bacteriene sunt mai active în perioada de întărire a pastei.

Pentru fabricarea biscuiţilor reţeaua proteică trebuie să fie suficient dispersată pentru a da un produs friabil. Alături de textură, proteazele acţionează şi asupra proprietăţilor organoleptice ale produsului.

Utilizarea preparatelor proteolitice pentru frăgezirea cărnii şi fabricarea membranelor pentru salamuri.

În literatură sunt descrise diferite procedee de îmbunătăţire a frăgezimii cărnii de vită prin injectarea intraarterială a unei soluţii conţinând enzime proteolitice microbiene.

Carnea astfel tratată poate fi dată imediat pentru consum sau se poate păstra în frigorifere până la 3 săptămâni.

Pentru fabricarea membranelor comestibile pieile sunt tratate cu preparate proteolitice în aşa fel încât ele pot fi extrudate într-o baie de coagulare cu sulfat de amoniu. Prin tratare în continuare se obţin membrane foarte fine pentru salamuri, rezistente la presiune şi temperatură în timpul fierberii şi prăjirii fără a se încreţi, rupe sau fără a se topi.

Utilizarea proteazelor în industria peştelui

Peştele sau produsele din peşte prelucrate cu ajutorul sistemelor enzimatice prezente în bacteriile lactice puternic reducătoare duce la scindarea aminelor şi la hidratarea compuşilor nesaturaţi din peşte, în special a acidului clupeinic. Prin acest procedeu este înlăturat mirosul şi gustul neplăcut al produselor, de peşte destinate pentru furajarea animalelor şi la eliminarea gustului de peşte în carnea animalelor hrănite cu aceste produse.

Diferitele produse din peşte pot fi maturate cu ajutorul proteazelor fungice. Astfel scrumbiile eviscerate, cu capetele şi oasele înlăturate sunt supuse acţiunii enzimelor. Preparatele enzimatice utilizate în acest scop nu trebuie să manifeste activitate lipolitică. Sub acţiunea enzimelor peştele se menţine 2 – 4 săptămâni (în loc de 6 luni) la temperaturi obişnuite.

8.5.6. Biosinteza glucozoxidazei

Glucozoxidaza elaborată de Aspergillus niger este considerată a fi o enzimă intracelulară, cum este şi de aşteptat pentru o enzimă implicată în mecanismul metabolismului energetic.

Preparatele enzimatice comerciale de glucozoxidază sunt obținute din miceliul de Aspergillus niger dezvoltat în principal pentru producția de acid gluconic sau sărurile acestuia, gluconat de sodiu sau gluconat de caliu fiind folosite în industria farmaceutică.

8.5.6.1. *Utilizările glucozoxidazei*

Sistemul enzimatic glucozoxidază-catalază este utilizat în industria alimentară pentru îndepărtarea glucozei și a oxigenului din diferite produse.

Astfel prin îndepărtarea glucozei din albușul de ou sau ouă întregi înaintea pasteurizării și uscării se evită apariția reacțiilor de tip Maillard.

Consumarea oxigenului rezidual din produsele alimentare, în prezența excesului de glucoză și a glucozoxidazei evită reacțiile de oxidare și dezvoltarea microorganismelor aerobe. Îndepărtarea enzimatică a oxigenului se aplică pentru conservarea maionezei, laptelui praf, prafului de ouă, cafelei prăjite, untului, brânzei, produselor din carne. Pentru aceasta preparatul enzimatic de glucozoxidază-catalază se dizolvă într-un tampon care conține glucoză și se ambalează în pungi de polietilenă permeabilă la aer și impermeabilă la apă. Preparatul enzimatic astfel condiționat se închide în ambalaj odată cu produsul de conservat. În acest mod oxigenul difuzează prin membrana de polietilenă fiind consumat cantitativ din recipientele ermetic închise care conțin produsele alimentare amintite.

Glucozoxidaza mai poate fi utilizată și pentru mărirea stabilității diferitelor băuturi (bere, vin, sucuri de fructe) ambalate în sticle sau cutii metalice. În ultimul caz se inhibă și procesul de coroziune.

Glucozoxidaza se mai utilizează pentru: obținerea acidului gluconic și a sărurilor sale de înaltă puritate, costabilizarea acidului ascorbic și cianocobalaminei (vit. B_{12}) în preparatele apoase de vitamine, fabricarea pastei de dinți și a gumei de mestecat ca agent antimicrobian, mărirea vitalității lactobacililor din preparatele de uz intern, conservarea lichidului seminal în zootehnie, maturarea făinii, coagularea laptelui prin acidifiere.

Catalazele au o largă răspândire fiind prezente în celulele animalelor și plantelor superioare precum și la aproape toate microorganismele aerobe.

8.5.6.2. *Utilizările catalazei*

Preparatele enzimatice de catalază sunt utilizate în industria alimentară pentru pasteurizarea ouălor, conservarea laptelui, declanșarea formării diacetilului.

Utilizarea H_2O_2 pentru reducerea numărului bacteriilor din lapte a fost sugerată încă din 1900.

Tratamentul peroxid-catalază este indicat la fermele unde nu există echipament de răcire, iar pasteurizarea termică nu este fezabilă tehnic. S-a sugerat adăugarea a 1 ml H_2O_2 având concentrația 33% la 1 l de lapte, la fermă, urmată de adăugarea a încă 1 ml de H_2O_2 la fabrica de produse lactate, încălzirea la 50°C timp de 30 minute urmată de răcire al 35°C și adăugare de catalază.

Tratamentul peroxid-catalază poate fi utilizat la pasteurizarea laptelui pentru fabricarea brânzeturilor. Tratamentul cu H_2O_2 micșorează numărul microorganismelor patogene inactivând catalaza și peroxidaza din lapte, fără a afecta lipazele, proteazele și fosfatazele.

Tratamentul cu H_2O_2 și catalază nu poate înlocuit total pasteurizarea termică, deoarece microorganismele sporulate aerobe sunt rezistente la acțiunea oxidantului.

Microorganismele lactice au o rezistență intermediară, iar bacteriile coliforme sunt foarte puțin rezistente la acest tratament.

H_2O_2 scade lent tensiunea de coagulare având ca rezultat producerea unei brânze cu corp elastic, iar supradozarea peroxidului determină obținerea unei brânze mătăsoare cu gust amar și care înglobează multă apă.

O altă utilizare a catalazei este îmbunătățirea calității concentratelor și izolatelor proteice din soia prin îndepărtarea peroxizilor. Aceasta are ca rezultat îmbunătățirea indicelui de solubilitate al azotului și caracteristici gustative superioare prin eliminarea amărelii și astringenței.

8.5.7. Enzime imobilizate

Utilizarea preparatelor enzimatice imobilizate la transformarea, prin cataliză eterogenă, a diferitelor substrate, tinde să devină o practică de lucru curentă datorită avantajelor pe care le prezintă:

a) permite utilizarea repetată a enzimei (cu aceeași cantitate de enzimă se poate prelucra o cantitate mai mare de substrat);
b) permite lucrul în instalații semicontinui și continui (micșorând volumul instalației, permițând automatizarea proceselor);
c) enzima nu se regăsește în produs (se elimină faza de inactivare termică a enzimei);
d) transformarea substratului se poate opri la momentul dorit printr-o simplă operație mecanică;
e) se pot trata în condiții economice soluții diluate de substrat (ape reziduale, subproduse etc.);
f) se pot deplasa în mod controlat spre anumite valori pH-ul optim și temperatura optimă de acțiune a enzimei;

g) la utilizarea procedeelor continui scade timpul de contact între enzimă, substrat, produse (față de procedeele discontinui); scade în acest mod posibilitatea formării de produse secundare nedorite.

8.5.7.1. *Tehnici de imobilizare a enzimelor*

Procedee fizice de imobilizare. Adsorbția pe suporturi solide

Adsorbția se realizează în principal prin două tipuri de mecanisme: în cel dintâi rolul de liant între suport şi enzimă aparține forțelor Van der Waals; în cel de-al doilea unor forțe electrostatice coulombiene. Distincția dintre cele două mecanisme nu este netă, dar o primă indicație o pot furniza timpul necesar atingerii stării de echilibru (mai mare în cel de-al doilea caz) şi natura adsorbantului.

Legătura suport insolubil-enzimă este relativ slabă. Desorbția se produce la modificarea pH-ului mediului de reacție, a tăriei sale ionice, sau la simpla ridicare a temperaturii. Aceasta constituie un dezavantaj major, preparatul imobilizat având o stabilitate redusă, iar produsele reacției fiind impurificate cu enzimă. Desorbția permite însă regenerarea suportului într-o nouă formă activă.

Includerea în structuri macromoleculare

Se poate include enzima în rețeaua formată de legăturile covalente ale unui polimer reticulat. Dacă gradul de reticulare este mic, atunci ochiurile rețelei sunt mari, iar enzima poate evada din gel fiind antrenată de soluția de substrat. Dacă gradul de reticulare este mare, evaziunea enzimei este împiedicată, dar accesul moleculelor de enzimă la centrii activi este la rândul său îngreunat. Trebuie deci găsit raportul între monomer şi agentul de reticulare care să nu permită evadarea enzimei în mediul de reacție dar să nu limiteze accesibilitatea la centrii activi ai enzimei. Practic procesul nu este utilizabil decât dacă masa moleculară a enzimei este mult mai mare decât a substratului.

Microencapsularea preparatelor enzimatice

Tehnicile de microencapsulare efectuează includerea enzimelor în microsfere cu pereți permeabili pentru moleculele de substrat şi produs, cu masă moleculară mică şi impermeabili pentru macromoleculele de enzimă.

Imobilizarea în celule de ultrafiltrare

Principiul efectuării reacțiilor enzimatice în celulele de ultrafiltrare este simplu; soluția de enzimă şi soluția de substrat reacționează sub o

anumită presiune; produsele de reacție cu masă moleculară mică sunt evacuate din celulă, dar membrana nu permite trecerea enzimei. Sistemul este agitat energic pentru a evita fenomenul de polarizare a concentrației la suprafața membranei de ultrafiltrare.

Procedee chimice de imobilizare

Imobilizarea enzimelor prin reticulare intermoleculară

Produsele de reacție ale proteinelor cu reactivi bifuncționali se împart în trei categorii:

a) proteine reticulate intramolecular;
b) proteine reticulate intermolecular (homopolimeri);
c) complexe proteice reticulate intermolecular (heteropolimeri).

Alegerea unui anumit reactiv bifuncțional trebuie să aibă în vedere scopul urmărit prin reacție, domeniul de stabilitate al reactivului și al proteinei. Majoritatea reactivilor bifuncționali sunt insolubili sau puțin solubili în mediul apos, deci în soluțiile tampon utilizate curent pentru reacțiile proteinelor.

Legarea covalentă a enzimelor de suporturi insolubile reactive

Legarea covalentă a unei enzime la un suport insolubil presupune obținerea suportului într-o formă activă, urmată de reacția între această formă și enzimă. Reacțiile de cuplare propriu-zise se pot clasifica în modul următor: a) enzima se cuplează direct la un intermediar reactiv stabil; b) enzima se cuplează direct la un intermediar reactiv nestabil, preparat în *situ*.

Suporturi anorganice

Un procedeu frecvent utilizat la prepararea suporturilor anorganice reactive este silanizarea acestora. Rectivul silanic (ester, halogenură, silanol) se cuplează, în mediu anhidru, cu grupările hidroxil ale suportului: prezența apei determină o prehidroliză a reactivului silanic, cu formarea de grupări hidroxil libere care se cuplează la grupările suportului.

Suporturi macromoleculare de origină naturală

Colagenul constituie un suport ideal pentru imobilizarea enzimelor; este ieftin și abundent, permite efectuarea reacțiilor de cuplare în condiții blânde, este hidrofil și caracterizat printr-o densitate ridicată a grupărilor reactive, deține o capacitate ridicată de gonflare în apă (absoarbe apă până la 100% din greutatea proprie la pH neutru și până la 500% la pH = 2) și poate fi modificat chimic în vederea accentuării unor caracteristici (reticulare pentru obținerea unei structuri mai rezistente, tratare cu enzime proteolitice pentru micșorarea activității antigenice, blocarea grupărilor amino sau carboxil libere pentru a modifica încărcătura electrică superficială).

Cuplarea enzimelor la suportul de colagen se realizează prin amestecarea soluției apoase de enzimă cu o suspensie de colagen urmată de reticularea produsului rezultat cu aldehida glutarică.

Celuloza și derivații săi s-au utilizat ca suporturi de imobilizare a enzimelor datorită accesibilității lor la prețuri scăzute, caracterul lor extrem de hidrofil și densității ridicate de grupări reactive. Prin tratarea celulozei cu acid alfa-cloracetic în mediu alcalin se obține carboximetilceluloza; esterul ei metilic formează hidrazida corespunzătoare prin reacție cu hidrazina.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Capitolul II

DOZAREA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE. METODE DE ANALIZĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMELOR UTILIZATE ÎN FABRICAREA ALIMENTELOR

1. DOZAREA ACTIVITĂȚII GLUCOZOXIDAZEI (METODA VOLUMETRICA UNDERKOFLER)

Principiul metodei

Determinarea activității glucozoxidazei se bazează pe măsurarea prin titrare a acidului gluconic format în urma acțiunii glucozoxidazei asupra glucozei în prezenta oxigenului.

Definiția unității

Unitatea de glucozoxidază este egală cu cantitatea de acid gluconic format în 15 minute la 35°C în prezența oxigenului, de către un gram de enzimă.

Reactivi

1. Soluție tampon cu pH=5,1

2,84ml (3g) acid acetic glacial şi 2,92 g NaCl se dizolva în cca. 900 ml apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml şi se aduce la pH=5,1 cu NaOH (cu pH-metrul). Apoi balonul se aduce la semn cu apă distilată.

2. Soluție saturată de octodecanol în alcool sau altă substanță antispumantă.

3. Soluție de hihroxid de sodiu 0.1 N

Se dizolvă 4 grame NaOH în rotulis în apă distilată şi se aduce volumul la100 ml.

4. Soluție acid clorhidric 0,05 N

5. Soluție de fenolftaleină 1%

6. Soluție de glucoză (substrat)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se dizolvă 30 grame glucoză monohidrat în 1000 ml tampon pregătit ca la punctul 1. Această soluție se va folosi după cel puțin o oră de la preparare.

7. Soluția de enzimă

Modul de lucru

Într-o eprubetă de 25×300 mm se pipetează câte 25 ml din soluția de substrat tamponată şi se încălzeşte pe baie de apă la 35°C. Apoi se adaugă 1 ml soluție de enzimă (cca. 15 U glucozoxidază)

Se adaugă 3 picături antispumant şi se aerează cu ajutorul unui injector cu sticla poroasă cu un debit de 700 ml/minut, exact 15 minute. Conținutul eprubetei este trecut în balonul Erlenmayer de 150 ml care conține 10 ml soluție NaOH 0,1N, eprubeta spălându-se de două ori cu apă distilată. Apele de spălare sunt adăugate, de asemenea, în balonul Erlenmayer. Conținutul balonului este titrat cu soluție de HCl 0,05N folosindu-se fenolftaleina ca indicator.

În acelaşi mod se prepară o probă oarbă unde soluția de enzimă se adaugă după ce a fost inactivată prin încălzire timp de 15 minute pe baie de apă la fierbere.

Calculul rezultatelor

$$\text{U glucozoxidza/g} = \frac{(V_m - V_p) \times 3 \times 1000}{A}$$

unde:

V_m – ml HCl 0,05N folosiți la titrarea probei martor;

V_p – ml HCl 0,05N folosiți la titrarea probei cu enzima activă;

A – mg enzima într-un ml probă;

3 – constanta de calcul.

1.1. METODA RAPIDĂ DE DETERMINARE A ACTIVITĂȚII GLUCOZOXIDAZEI ÎN PREPARATELE LIPSITE DE CATALAZĂ

(Catalaza se poate inactiva prin acidulare cu acid acetic până la pH = 3,03, apoi încălzire la 56°C timp de 5 minute şi răcire rapidă.)

Reactivii necesari

1. Soluție de glucoză 3,3% în tampon acetat de pH=5,8. Se prepară cu o oră înaintea determinării.

2. Soluție de iodură de potasiu 5%. Se prepară înaintea fiecărei determinări.
3. Soluție amidon 1%
4. Soluție molibdat de amoniu 1%
5. Soluție tiosulfat de sodiu 0,02N
6. Soluție acid sulfuric 5N
7. Soluția de enzimă.

Modul de lucru

Într-un balon cotat de 50 ml se toarnă 4,5 ml soluție de glucoză 3,3% în tampon acetat 0,1N de pH = 5,8 și 0,5 ml soluție de enzimă (care conține 2-3 unități).

Proba se incubează cu agitator (120 rotații/minut) la temperatura camerei timp de 10 minute. Reacția este oprită prin adăugare de 2 ml soluție acid sulfuric 5N.

La amestec se adaugă o picătură de soluție de molibdat de amoniu 1% și 2 ml soluție iodură de potasiu 5%.

În urma reacției produse între peroxidul de hidrogen și iodura de potasiu ionul de iod se oxidează și trece în iod molecular, în cantitate echivalentă cu peroxidul de hidrogen care a participat la reacție. Se formează o coloratie care durează 3 minute. Iodul se titrează cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,02N.

Se efectuează paralel o probă martor cu enzimă inactivată în prealabil.

Unitatea de activitate a glucozoxidazei va fi în acest caz egală cu cantitatea de apă oxigenată (peroxid de hidrogen) în mg care se formează prin acțiunea a 0,5 ml enzimă în timp de 10 minute.

$$a = v \times 0{,}34$$

unde:

a – cantitatea de peroxid de hidrogen;

v – ml soluție tiosulfat de sodiu 0,02N folosiți la titrare;

0,34 – cantitatea de peroxid de hidrogen în mg care corespunde la 1 ml soluție 0.02N de tiosulfat de sodiu.

Formarea unui micromol de apă oxigenată (0,034) corespunde, la temperatura de 20°C, unui consum de 24,03 microlitri oxigen.

0,034 mg H_2O_2 corespund la.....24,03 µl O_2

a x

BCU IAȘI - CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

$$x = \frac{24{,}03 \times a}{0{,}034}$$

$$U_{glucozoxidaza}/g = \frac{a \times 24{,}03 \times 1000}{0{,}034 \times 24{,}03 \times 10} = \frac{a \times 100000}{34 \text{ mg enzima pudra}}$$

Inconvenientul metodei volumetrice este că, nu în toate cazurile, ∂ – lactona acidului gluconic are timp să se transforme în acid gluconic.

2. DOZAREA ACTIVITĂȚII GLUCANAZEI (METODA NOVO)

Principiul metodei

O soluție de β-glucan din orz este degradată sub acțiunea glucanazei iar puterea reducătoare a compușilor de hidroliza obținuți este determinată prin metoda Somogyi- Nelson.

Definiția unității

O unitate β-glucanaza este definita ca o cantitate de enzima care, în condițiile de reacție, produce atâția hidrați de carbon reducători pe minut încât puterea sa reducătoare corespunde aceleia a unui μmol de glucoza.

Condiții standard

pH = 7,5;
temperatura = 30°C;
concentrație substrat = 0,5% β-glucan.

Reactivi

1. *Soluția de β-glucan 1%*

600 mg β-glucan sunt suspendate cu grijă în 30 ml apă rece. Suspensia este încălzită timp de 5 minute în baie de apă fierbinte. După răcire parțială se filtrează până la limpede strălucitor și se introduc 25 ml filtrat în balon

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cotat de 50 ml. Se adaugă 20 ml tampon fosfat şi se măsoară pH-ul. În caz de nevoie se ajustează la 7,5.

Balonul cotat se umple cu tampon fosfat până la semn. Această soluție 1% de β-glucan (substratul) se păstrează la frigider. În cazul în care ea prezintă un precipitat fin, soluția poate fi limpezită prin filtrare.

2. *Reactivul cupric Somogyi*

35,1 g fosfat disodic Na_2HPO_4. $2H_2O$ şi 40 g sare Rochell (tartrat dublu de sodiu şi potasiu – $KNaC_4H_4O_2$. $4H_2O$) sunt dizolvați în 700 ml de apă dedurizată şi se adaugă:

– 80 ml soluție 10% sulfat de cupru ($CuSO_4$. $5H_2O$);
– 4 g NaOH;
– 180 g sulfat de sodiu anhidru (Na_2SO_4).

După dizolvarea completă a substanțelor adăugate se aduce volumul la 1000 ml cu apă dedurizată.

3. *Reactivul colorat Nelson*

50 g heptamolibdat de amoniu $[(NH_4)_6Mo_7O_4.4H_2O]$ sunt dizolvați în 900 ml apă dedurizată. Apoi se adaugă 42 ml H_2SO_4 concentrat şi 6 g dihidrogen arseniat de sodiu heptahidrat (Na_2HasO_4. H_2O) care se dizolvă în 50 ml apă dedurizată. Se completează la 1000 ml cu apă dedurizată. Soluția trebuie să stea după preparare timp de 24-48 ore la 37°C. Se păstrează la întuneric în sticlă brună cu dop rodat.

Modul de lucru

Pentru efectuarea analizei se iau 4 eprubete în care se adaugă:

Eprubeta 1: 0,5 ml substrat;
Eprubeta 2: 0,5 ml tampon fosfat M/30, pH=7,5;
Eprubeta 3: 0,5 ml substrat + 0,5 ml apă;
Eprubeta 4: 1 ml apă;

Eprubeta 1 reprezintă proba de analizat, eprubeta 2 reprezintă proba oarbă cu enzimă, eprubeta 3 reprezintă proba oarbă cu substrat iar eprubeta 4 reprezintă proba oarbă cu apă.

Eprubetele sunt preîncălzite într-un termostat la temperatura de 30°C. La punctul 0 se adaugă în eprubeta 1 0,5 ml soluție enzimă şi după ½ minute 0,5 ml soluție de enzimă în eprubeta 2. După adaos, toate cele 4 eprubete se agită, se închid cu dop de sticlă şi se aşează în termostat la 30°C. După o durată de reacție de 30 minute, se adaugă în cele 4 eprubete câte 1 ml reactiv

cupric Somogyi la intervale de 0,5 minute şi se agită eprubetele. Prin aceasta, reacţia enzimatică este stopată. În continuare se efectuează analiza zahărului reducător după metoda Nelson-Somogyi după cum urmează:

Eprubetele sunt încălzite timp de 20 minute în baia de apă la fierbere.

Cu fiecare serie de analize se mai efectuează o probă standard de glucoză cu 0,02 mg glucoză/ml şi o probă standard de glucoză cu 0,4 mg/ml la care se adaugă de asemenea 1 ml reactiv cupric Somogyi. După fierbere se adaugă în fiecare eprubetă 1 ml reactiv Nelson şi eprubeţa este scuturată cu grijă până când tot precipitatul format se dizolvă. Se adaugă apoi 20 ml apă distilată şi eprubeta se agită pentru omogenizare. Se măsoară extincţia coloraţiei formate în cuve de 10 mm la 670 nm faţă de apă ca martor.

Calculul activităţii

Într-o analiză au fost cântărite 300 mg preparat enzimatic şi s-au dizolvat în 200 ml apă. După filtrare s-a diluat soluţia de 25 ori (4ml→ 100 ml). Au fost citite următoarele extincţii:

1. 0,284
2. 0,016
3. 0,205
4. 0,016
5. 0,056 (soluţia de 0,02 mg glucoză/ml)
6. 0,850 (soluţia de 0,4 mg glucoză/ml)

Deci activitatea β-glucanazei în unităţi/g va fi:

$$U_{\beta\text{-glucanaza/g}} = \frac{(0{,}128 - 0{,}09) \times 200 \times 25}{0{,}180 \times 0{,}30 \times 30^{1} \times 0{,}5} = 235 \text{ U/g}$$

unde:

– 0,128 reprezintă cantitatea de glucoză/ml corespunzătoare diferenţei de extincţie dintre proba 1 şi proba 2;

– 0,090 reprezintă cantitatea de glucoză/ml corespunzătoare diferenţei de extincţie dintre proba 3 şi proba 4;

– 0,180 reprezintă masa glucozei;

– 0,30 reprezintă cantitatea de enzimă în grame luată în lucru;

– 30 reprezintă durata reacţiei în minute;

– 0,5 reprezintă volumul de probă luat pentru analiză.

3. DOZAREA ACTIVITĂȚII PEROXIDAZEI

Principiul metodei

Metoda se bazează pe oxidarea peroxidativă a guaiacolului în condițiile metodei adică oxidarea unui mol de guaiacol cu un mol de peroxid de hidrogen rezultând în final un produs de dehidrogenare a guaiacolului denumit GDPH. Cantitatea de GDPH rezultată se determină spectrofotometric.

Definiția unității

O unitate de activitate peroxidazică conform metodei este cantitatea de enzimă care catalizează oxidarea peroxidativă a guaiacolului (GDP) cu producerea unui compus de dehidrogenare într-un minut la pH = 7 și la 25°C.

Reactivi

1. *Tampon fosfat pH=7*

Soluția A: se cântăresc 13,61 g fosfat monopotasic (KH_2PO_4) și se aduc la 1000 ml cu apă bidistilată.

Soluția B: se cântăresc 22,82 g fosfat dipotasic trihidrat ($K_2HPO_43H_2O$) și se aduc la volum de 1000 ml cu apă bidistilată.

Soluția tampon fosfat de pH=7 se obține amestecând 39 ml soluție A cu 61 ml soluție B. Soluția tampon se păstrează la temperatura camerei timp de maxim patru săptămâni.

2. *Soluție substrat guaiacol 20,1 mM*

Se dizolvă 249 mg guaiacol sintetic cristalizat ($C_7H_8O_2$) și se aduc la volum de 100 ml cu apă bidistilată.

3. *Soluție de peroxid de hidrogen 0,042%*

0,14 ml peroxid de hidrogen (H_2O_2) se aduc la volum de 100 ml cu apă bidistilată.

Aparatura

1. Baie de apă termoreglabilă cu exactitate de menținere a temperaturii de 0,1°C.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
B.C.U. "M. Eminescu"

2. Balanța analitică
3. Cronometru
4. Spectrofotometru care permite citirea absorbantei la 240 nm și la 436 nm în cuve cu grosimea stratului de 1 cm.

Modul de lucru

Soluțiile care urmează a fi folosite (tamponul fosfat, soluția de substrat guaiacol și enzima, diluată sau nu, după caz) se mențin în baie de apă la 25°C timp de 10 minute.

Se adaugă reactivii în următoarea ordine: 3 ml tampon fosfat, 0,05 ml substrat guaiacol 0,1 ml enzimă și 0,03 ml soluție peroxid de hidrogen.

Se omogenizează rapid și se introduce din amestecul obținut (V) în cuva spectrofotometrului. Se citește absorbanța. După o creștere a absorbantei cu 0,05 unități se pornește cronometrul și se măsoară timpul necesar pentru o nouă creștere a absorbantei cu $\Delta A = 0{,}100$.

Timpul măsurat trebuie să fie cuprins în intervalul 1-3 minute, în caz contrar enzima trebuie diluată corespunzător.

Calculul rezultatelor

Activitatea enzimatică a peroxidazei A_{POD}, exprimată în unități peroxidazice la litru de enzimă, se calculează cu relația:

$$A_{POD} = \frac{V \times 1000}{\varepsilon \times d \times v} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad [\text{U/l}]$$

unde:

V = volumul amestecului de reacție în mililitri (3,18 ml);

ΔA = variația absorbanței (0,100);

1000 = factor de transformare din mililitri în litri;

ε = coeficient de absorbanță al produsului de dehihdogenare a guaiacolului la 436 nm (639 $cm^2/\mu moli$ guaicol oxidat);

d = grosimea stratului de lichid din cuvă (1 cm);

Δt = intervalul de timp necesar creșterii absorbanței cu ΔA în secunde;

v = volumul de enzimă luat în lucru, în mililitri (0,1 ml).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. DOZAREA ACTIVITĂȚII CELULOZOLITICE C_x ÎN MEDII DE CULTURA ŞI PREPARATE CELULOZOLITICE

Ca metoda pentru determinarea activității celulozolitice C_x s-a ales metoda denumită CMC adaptată posibilităților existente în laborator.

Principiul metodei

Metoda are la bază proprietatea preparatelor celulozolitice C_x care, în anumite condiții, lichefiază (hidrolizează) celuloza solubilă cum ar fi carboximetilceluloza (CMC) în celodextrine şi celobioză.

Se lasă să acționeze preparatul enzimatic de cercetat un anumit timp asupra unei soluții de CMC, de concentrație cunoscută, în anumite condiții, după care se calculează descreşterea vâscozității.

Amestecul de reacție conține:

- 10 ml soluție CMC 1%;
- 4 ml soluție tampon citrat de concentrație 0,05M, pH = 4,5;
- 1 ml filtrat de cultură (diluat sau nu) din proba de cercetat (pentru determinarea activității celulozolitice C_x a probei de analizat);
- 1 ml apă distilată (la proba martor).

Se incubă 30 minute la 30°C, după care se calculează descreşterea vâscozității, calculată după formula:

$$\Delta V = \frac{KT_0 - KT_{30}}{KT_0}$$

unde:

– KT_0 este timpul de scurgere pentru amestecul de control (martor);

– KT_{30} este timpul de scurgere pentru amestecul de cercetat (cu enzimă).

Se caută să se obțină valori cuprinse în intervalul 0,4-0,5. Se consideră că valoarea 0,5 corespunde la 50% lichefiere a CMC. Deoarece 15 ml amestec de reacție conțin 100 mg CMC, astfel încât descreşterea vâscozității cu 50% este egală cu lichefierea a 50 mg CMC.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Definiția unității

Activitatea celulozolitică se exprimă în mg CMC lichefiate de 1 ml filtrat de cultură calculată după formula:

$$\text{Activitatea celulozolitică } C_x = \frac{50}{A}$$

unde:

– A este volumul de filtrat de cultura în ml, necesar pentru a obține scăderea la jumătate a vâscozității.

Reactivi

1 *Prepararea soluției de enzimă*

Mediul fermentat filtrat sau preparatul enzimatic folosit se diluează corespunzător cu apă distilată, în așa fel încât la calcularea descreșterii vâscozității, valoarea raportului respectiv să se încadreze în limitele de 0,4–0,5, cum indică metoda.

2 *Prepararea substratului carboximetilceluloza (CMC) soluție 1%*

1,00 g CMC cântărite cu precizie de 0,01g se introduc într-un balon cotat de 100 ml. Se adaugă cca. 70 ml apă distilată şi se lasă timp de 24 ore pentru gonflare. Se completează cu apă distilată la semn şi se omogenizează prin agitare. Se filtrează prin filtru de sticla G_1.

Dizolvarea se face la temperatura camerei. Daca dizolvarea a fost suficientă pe filtru nu rămân mai mult de 0,01 g. Substratul se poate păstra la frigider la +3°C – +4°C timp de 4-5 zile.

3 *Soluția de tampon citrat 0,05 M, pH=4,5*

Se prepară din soluție de citrat de sodiu ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) 0,1M şi soluție de acid citric ($C_6H_8O_7H_2O$) 0,1M prin amestecare şi diluare.

4. *Soluție de acid citric 0,1 M*

21,014 g acid citric se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml. Se aduce la semn cu apă distilată şi se omogenizează prin agitare.

5 *Soluție citrat de sodiu 0,1 M*

29,413 g citrat de sodiu se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml. Se aduce la semn cu apă distilată şi se omogenizează prin agitare.

BCUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Se amesteca 40 ml soluție de acid citric 0,1 M cu 60 ml soluție citrat de sodiu 0,1 M rezultând 100 ml soluție tampon citrat 0,1 M cu pH=4,5. Se iau 50 ml soluție tampon citrat 0,1 Mcu pH=4,5 şi se amesteca cu 50 ml apă distilată. Rezultă 100 ml soluție tampon citrat 0,05 M cu pH=4,5.

Aparatura şi sticlăria necesare

– vâscozimetru Ubbelohde (capilara nr. 2);
– baie termostat reglată la 30°C ± 0,05°C;
– cronometru;
– baloane cotate de 100 ml şi 1000 ml;
– creuzete filtrante G_1 şi $3G_2$;
– eprubete 25/250.

Modul de lucru

Temperatura soluției tampon, a soluției de enzimă, a substratului şi temperatura apei distilate folosite la diluare şi la proba martor trebuie sa fie de 30°C.

Prepararea amestecului de reacție

În eprubete încălzite la 30°C se introduc pe rând 4 ml soluție tampon citrat 0,05 M cu pH=4,5, 10 ml soluție CMC 1% şi 1 ml soluție de enzimă. Se omogenizează prin agitare şi se introduce în vâscozimetrul uscat şi încălzit la 30°C. Timpul de reacție se socoteşte din momentul adăugării soluției de enzimă.

Vâscozimetrul se introduce în termostat la 30°C şi, după exact 30 minute, se determină vâscozitatea, calculându-se descreşterea după formula cunoscută.

Determinarea se repetă şi dacă de trei ori nu prezintă o abatere mai mare de 5% – eroare probabilă – se alege media aritmetică a acestor determinări care se foloseşte la calcul.

Se execută şi o probă martor, procedând la determinare exact ca mai înainte cu deosebirea că, în locul unui ml de enzimă, se adaugă un ml de apă distilată.

BCU "Ion Creangă" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Calcularea activității

Calculând descreşterea vâscozității şi obținând

$$\frac{KT_0 - KT_{30}}{KT_0} = 0,5$$

se consideră că valoarea de 0,5 corespunde la 50% lichefiere a CMC, iar 15 ml amestec de reacție folosit la determinare conțin 100 mg CMC astfel încât descreşterea vâscozității cu 50% este egală cu lichefierea a 50 mg CMC.

Activitatea se exprimă în mg CMC lichefiate de 1 ml filtrat de cultură, calculată după formula:

$$UC_x = \frac{50}{A}$$

unde:

– A este volumul de filtrat de cultură folosit, în ml, necesar pentru a obține scăderea la jumătate a vâscozității.

Exemplu de calcul

Se presupune că timpul de scurgere pentru amestecul de reacție martor KT_0 este 100 secunde iar timpul de scurgere pentru amestecul de reacție cercetat KT_{30} este 55 secunde. În acest caz,

$$\text{descreşterea vâscozității} = \frac{100 - 55}{100} = 0,45$$

Descreşterea vâscozității cu 45% este egala cu lichefierea a 45 mg CMC.

Activitatea celulozolitică în acest caz este:

$$UC_x = \frac{45}{1} = 45$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. DOZAREA ACTIVITĂȚII PROTEAZEI (METODA ANSON MODIFICATĂ)

Principiul metodei

La bază se află metoda Anson și anume, după acțiunea preparatului de protează analizat asupra soluției de substrat (cazeina în cazul proteazelor alcaline și neutre și hemoglobina în cazul proteazelor acide) se precipită proteinele nedescompuse cu acid triclor acetic 5% (ATA) și se determină în filtrat cantitatea de proteine digerate care nu se precipită cu ATA, prin reacția colorimetrică cu reactivul Folin. Cantitatea de proteine descompuse se consideră că este proporțională cu cantitatea de tirozina care se află în filtrat. Valorile obținute pentru densitatea optică în cazul probei de analizat se trec pe o curbă standard de tirozină.

Definiția unității

Ca unitate de activitate proteolitică (UP) se ia cantitatea de ferment care într-un minut, la 30°C catalizează trecerea în stare neprecipitabilă cu ATA a cantității de cazeină sau hemoglobină, după caz, care conține un micromol de tirozina (un micromol de tirozina = 0,181 mg).

Activitatea proteolitică a preparatului (AP) se exprimă prin numărul de unități proteolitice la 1 gram de preparat de enzimă, adică în micromoli tirozina găsită în stare neprecipitată de către soluția de ATA, la un gram de preparat.

Activitatea preparatelor nestudiate se verifica la trei pH-uri și anume: 3,0; 6,0; 8,0.. pentru a se stabili pH-ul optim de acțiune al preparatului proteazic.

Ca substraturi se folosesc: cazeina la pH 6,0 și peste 6,0 sau hemoglobina sub pH 6,0.

Condiții de hidroliză

Hidroliza enzimatică se face la o concentrație a substratului de 1% în mediul de reacție (după amestecarea soluției de proteină cu soluția de enzimă) iar durata de acțiune a enzimei asupra substratului este de 15–30 minute

Pentru precipitarea părții nehidrolizate a substratului se adaugă un volum egal de soluție apoasă de ATA 5%, se agită, se menține 20 minute la

30°C şi se filtrează. Cantitatea de enzimă adăugată trebuie să fie calculată astfel încât să existe un mare exces de substrat şi valorile măsurate ale densităţii optice la colorimetru să se afle în domeniul 0,3 – 0,6 când se folosesc cuve de 10 mm. Dacă densităţile optice obţinute sunt sub sau peste aceste valori determinarea trebuie repetată cu alte diluţii ale enzimei.

Această condiţie trebuie obligatoriu respectată deoarece în metoda Anson proporţionalitatea directă între cantitatea de enzimă şi cantitatea de proteine hidrolizate se respectă numai într-o zonă îngustă de concentraţie. În cazul lucrului cu alte diluţii care ies din limitele de proporţionalitate rezultatele obţinute vor indica valori eronate ale activităţii proteolitice.

Prepararea reactivilor

Prepararea soluţiei de enzima

– din culturi de mucegaiuri;

Din culturile uscate, bine mărunţite, se ia o cantitate de 1 gram (cântărită cu precizie de 0,001), se adaugă 100 ml apă distilată şi se menţine la 30°C timp de o oră, amestecând ocazional. Apoi se filtrează şi filtratul limpede este folosit în reacţia de hidroliză a proteinelor.

– din preparate lichide;

1 gram de lichid se introduce în balon cotat de 100 ml şi se aduce la semn cu apă distilată. Dacă soluţia nu este limpede, se filtrează.

– din preparate enzimatice purificate;

Se cântăreşte o cantitate de 0,1grame preparat într-un pahar Berzelius de 20-50 ml, se suspendă într-o cantitate mică de apă distilată cu ajutorul unei baghete de sticlă apoi se trece cantitativ într-un balon cotat de 100 ml, se aduce la semn cu apă distilată şi se filtrează prin filtru de hârtie.

– din preparate enzimatice înalt purificate;

Se cântăresc cu precizie analitică 0,02 grame preparat şi se procedează la fel ca în cazul preparatelor purificate.

– din mediul de cultură;

Pentru analiză se ia direct lichidul de cultură, fără diluare sau cu diluare şi activitatea se exprimă în unităţi la 1 ml lichid de cultură.

Soluţiile de enzimă preparate ca mai sus se pot păstra timp de 24 ore la temperatura de 3°C–5°C.

Prepararea soluţiei de substrat

Soluţia de cazeină 2%

Se cântăresc 2 grame cazeină substanţă uscată, se adaugă 100 ml tampon fosfat M/15 de pH= 8 şi se încălzeşte până la dizolvare completă pe

baie de apă, amestecând cu bagheta. După răcire se verifica pH-ul şi, dacă este necesar, se ajustează la 8,0 cu NaOH.1N sau HCl 1N. Soluţia se poate păstra la frigider cel mult trei zile.

Soluţia de hemoglobină 2%

Se cântăresc 2 grame hemoglobină substanţă uscată, se freacă în mojar cu o mică cantitate de apă distilată apoi se trece cantitativ într-un balon cotat de 100 ml şi se aduce pH-ul la 3,0 cu HCl 0,3N. Se completează la semn cu apă distilată. Soluţia nu este stabilă şi trebuie preparată zilnic. În cazul folosirii hemoglobinei ca substrat în mediu neutru (pH=6.0) sau alcalin (pH=8,0) hemoglobina se prepară astfel: se dizolvă 2,2 grame hemoglobină în 100 ml tampon fosfat M/15 cu pH corespunzător, se adaugă 36 grame uree şi se lasă la temperatura camerei timp de 30-60 minute pentru denaturare. Apoi se verifica pH-ul şi se aduce la valoarea necesară cu acid sau hidroxid.

Prepararea soluţiei de acid tricloracetic(ATA) 0,3 M

Se cântăresc la balanţa tehnică 50 grame ATA şi se trec în balon cotat de 1 litru cu apă distilată. Se aduce la semn şi se filtrează. Soluţia este folosită la precipitarea proteinelor.

Prepararea soluţiei de tampon fosfat

Soluţia A: soluţie de KH_2PO_4 M/15: 9,077 g KH_2PO_4 se dizolvă în apă şi volumul se aduce la 1 litru. Se poate înlocui cu $NaH_2PO_4.12\ H_2O$, 9,2 g la 1 litru.

Soluţia B: soluţie M/15 de $NaH_2PO_4.12\ H_2O$: 23,883 g se aduc cu apă distilată la volum de 1 litru.

Pentru obţinerea tamponului fosfat cu pH=8,0 se amestecă 5,5 ml soluţie A şi 94,5 ml soluţie B. Se va verifica pH-ul tamponului la pH-metru..

Prepararea soluţiei de carbonat de sodiu 0,5M

Se cântăresc la balanţa tehnica 53 g Na_2CO_3 anhidru, se dizolvă în 100 ml apă distilată, se transvazează în balon cotat de 1 litru şi se completează la semn cu apă distilată.

Prepararea reactivului Folin

Soluţia de bază se prepară astfel: într-un balon de 2 litri prevăzut cu refrigerent ascendent se introduc 100 grame wolframat de sodiu (Na_2WO_4) şi 25 grame molibdat de sodiu ($Na_2MoO_4.2H_2O$). Se adaugă 700 ml apă distilată, 50 ml acid ortofosforic 85% având greutatea specifică (densitatea) 1,869 şi 100 ml acid clorhidric concentrat. Amestecul se fierbe la foc mic pe

BCU IASI - CENTRALA UNIVERSITARA

sită de azbest timp de 10 ore. Fierberea se poate întrerupe şi continua a doua zi. După fierbere conţinutul balonului se răceşte, se trece într-un balon Erlenmayer iar pereţii balonului de fierbere ca şi refrigerentul se clătesc cu 50 ml apă distilată. Apoi se adaugă 150 grame sulfat de litiu (Li_2SO_4) şi 5 picături de brom. Balonul deschis se încălzeşte şi conţinutul se fierbe la foc slab timp de 15-20 minute pentru a îndepărta vaporii de brom. Soluţia trebuie să aibă culoare galbenă. Daca soluţia este verde, tratarea cu brom se repetă. După răcire soluţia se aduce la volum de 1 litru cu apă distilată şi se filtrează prin vată de sticlă. Reactivul trebuie sa aibă aciditatea 2N. Concentraţia acidului se verifică prin tratarea reactivului diluat de 10 ori cu soluţie de Na OH 0,1N faţă de fenolftaleină. Soluţia preparată se păstrează în sticlă de culoare închisă. După 2-3 luni de depozitare se repetă tratamentul cu 2-3 picături de brom şi se fierbe din nou. Soluţia de lucru se prepară prin diluarea soluţiei de bază cu apă distilată în proporţie de 1:2. După prepararea soluţiei de lucru aciditatea acesteia nu trebuie să fie sub 0,6.

Modul de lucru

Pentru dozarea activităţii proteolitice se folosesc două eprubete de 18 cm şi cu diametrul de 2 cm în care se introduc câte 2 ml substrat iar eprubetele sunt plasate într-un termostat la 30°C. După 10 minute se adaugă în fiecare eprubetă câte 2 ml soluţie de enzimă, se agită şi se lasă pentru hidroliză exact 15 minute la 30°C. După 15 minute se adaugă în ambele eprubete câte 4 ml acid tricloracetic pentru a stopa reacţia enzimatică şi a precipita produsele macromoleculare şi proteinele nehidrolizate. Amestecul se agită rapid şi, pentru asigurarea precipitării complete, eprubetele se menţin la 30°C încă 20 minute. Apoi amestecul se filtrează prin filtru de hârtie în eprubete uscate. Filtratul trebuie sa fie perfect limpede. Se ia din filtrat câte un ml în alte eprubete şi se adaugă câte 5 ml soluţie Na_2CO_3 0,5 M, se amestecă agitând continuu, rapid şi se adaugă câte un ml soluţie de lucru din reactivul Folin. Lichidul de reacţie se lasă timp de 20 minute. După reacţie soluţiile capătă culoarea albastră şi intensitatea culorii se determină la fotocolorimetru. Proba martor se pregăteşte adăugând reactivii în ordine inversă: la 2 ml soluţie de enzimă se adaugă 4 ml soluţie acid tricloracetic, se menţine în termostat la 30°C timp de 15 minute, apoi se adaugă 2 ml soluţie de substrat. După 20 minute de menţinere în termostat soluţia se filtrează, se trece 1 ml într-o eprubetă uscată şi, sub agitare, se adaugă 5 ml Na_2CO_3 0,5 M şi 1 ml soluţie de lucru Folin. Proba martor este colorată slab în albastru.

Colorimetrarea se face la lungimea de undă de 670 nm în cuve de 10 mm

Înaintea citirii, aparatul este etalonat şi i se verifică punctul 0 faţă de apa distilată. Apoi în cuva din stânga se introduce martorul şi se determină valoarea absorbţiei faţă de apa distilată. În continuare în cuva din stânga se toarnă proba şi se citeşte valoarea absorbţiei faţă de apa distilată. Absorbţia reală a soluţiei va fi diferenţa dintre valoarea absorbţiei probei şi valoarea absorbţiei martorului. Pentru asigurarea preciziei analizei, valoarea densităţii optice trebuie să se afle, conform metodei, în intervalul 0,3 – 0,6. În calcule se foloseşte valoarea medie obţinută din doua experienţe paralele.

Calculul activităţii

Pentru calculul activităţii este necesar să se construiască curba etalon pentru tirozina având densitatea optică exprimată în micromoli de tirozina. Apoi, cu ajutorul curbei de calibrare, se calculează echivalentul de tirozină, adică densitatea optică dată de o soluţie de tirozină cu concentraţia de 1 micromol/ml şi notat cu ET. Acest echivalent trebuie calculat pentru fiecare nouă soluţie de reactiv Folin şi pentru fiecare fotocolorimetru. El are, de regulă, valoarea cuprinsă în intervalul 1,5 – 1,7.

Construirea curbei de calibrare

Pentru construirea curbei de calibrare se prepară o soluţie de tirozină cu concentraţia de 10^{-3} M. Pentru aceasta se cântăresc 181,19 mg tirozină şi se aduc la volum de 1 litru cu soluţie de HCl 0,2 M. Din această soluţie iniţială de tirozină se prepară următoarele diluţii:

Soluţia 1: într-un balon cotat de 50 ml se introduce 1 ml soluţie iniţială de tirozină şi se aduce la semn cu soluţie de HCl 0,2 M. Concentraţia tirozinei (C_1) în acest caz este

0,2. 10^{-4} M sau 0,02 micromoli/ml.

Soluţiile următoare se prepară în acelaşi fel:

Soluţia 2: 2 ml soluţie iniţială; $C_2 = 0,4. 10^{-4}$M sau 0,04 micromoli/ml;

Soluţia 3: 3 ml soluţie iniţială; $C_3 = 0,6. 10^{-4}$M sau 0,06 micromoli/ml

.....

Soluţia 7: 7,5 ml soluţie iniţială; $C_7 = 1,5. 10^{-4}$ sau 0,15 micromoli/ml

Soluţia 8: 10 ml soluţie iniţială; $C_8 = 2,0 . 10^{-4}$ sau0,20 micromoli/ml

Se introduce în eprubete câte 1 ml din fiecare din soluţiile de mai sus, se adaugă, sub agitare, câte 5 ml soluţie Na_2CO_3 0,5 M şi 1 ml soluţie de lucru Folin. Proba martor se prepară la fel dar în loc de soluţie de tirozină se

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ia 1 ml de apă distilată. Se lasă să reacționeze 20 minute. Intensitatea colorației formate se citește la fotocolorimetru la lungimea de undă de 670 nm în cuve de 10 mm față de martor care este, în acest caz, soluția de HCl 0,2 N. Valorile densităților optice citite se folosesc la trasarea curbei etalon unde, pe abscisă, se trec cantitățile de tirozină în micromoli/ml iar pe ordonată, valorile densităților optice corespunzătoare.

Pe baza acestei curbe trebuie dedus echivalentul de tirozină (ET) care este densitatea optică dată de 1 micromol de tirozină într-un ml. Să presupunem că pe curbă, 1 micromol de tirozină într-un ml dă densitatea optică 0,151. Deci valoarea ET = 1,51.

Calculul activității

Calculul activității se face cu următoarea formulă:

$$AP = \frac{E \times 4}{ET \times 15 \times n} \times 1000$$

unde:

E = densitatea optică măsurată;
4 = volumul amestecului de reacție în ml;
ET = echivalentul de tirozină;
15 = durata hidrolizei substratului în minute;
n = cantitatea de enzimă luată în lucru în mg/ml;
1000 = recalcularea unităților de protează obținute la 1 g de enzimă.

6. DOZAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI (METODA SIGMA)

Principiul metodei

Se determină scăderea absorbției provocată de prezența apei oxigenate la lungimea de undă de 240 mμ ca urmare a descompunerii acesteia de către catalază.

Reactivi

1. Soluție tampon fosfat pH=7, de concentrație 0,05M
2. Soluție apă oxigenată

Se aduc 0,1 ml soluție concentrată (30%) apă oxigenată la 50 ml cu soluție de tampon fosfat (punctul 1)

3. Soluție de enzimă

Modul de lucru

Soluția de apă oxigenată preparată în tampon fosfat trebuie sa aibă inițial o absorbție între 0,55 şi 0,52. Daca absorbția nu corespunde, se ajustează corespunzător soluția pentru a se încadra în aceste limite.

La 2,9 ml soluție substrat se adaugă 0,1 ml soluție enzimă. Se pune amestecul de reacție în cuva spectrofotometrului. Se aşteaptă până se atinge o valoare a absorbției de 0,45 şi se notează cu t_0 timpul la care s-a citit această valoare. Când absorbția a ajuns la 0,40 se notează din nou timpul cu t_1. Intervalul de absorbție 0,45 – 0,40 corespunde la descompunerea a 3,45 μmoli H_2O_2. Se împarte această valoare la intervalul de timp $t_1 - t_0$ şi se află unitatea Sigma corespunzătoare cantității de enzimă luată în lucru pe minut. Se calculează apoi numărul de unități corespunzător unui gram de enzimă.

7. DOZAREA ACTIVITĂȚII CATALAZEI (METODA BAKER)

Principiul metodei

Metoda se bazează pe dozarea, prin titrare cu tiosulfat de sodiu, a iodului pus în libertate dintr-o soluție de iodură de potasiu, în prezența apei oxigenate.

Reactivi

1. Soluție de apă oxigenată (substrat)

Se dizolvă 25 grame fosfat disodic (Na_2HPO_4) anhidru (sau 70,8 grame $Na_2HPO_4.12\ H_2O$) în 1,5 litri apă distilată. Se adaugă acid fosforic (H_3PO_4) 85% până la pH=7. Se adaugă 87,5 ml apă oxigenată 35% sau 100 ml apă oxigenată 30%. Se aduce la 2 litri. Soluția astfel obținută are concentrația 0,5M. Se păstrează în sticle brune la frigider şi poate fi folosită timp de o săptămână.

2. Soluție acid sulfuric 2N

55 ml acid sulfuric concentrat se aduc la 1000 ml cu apă distilată.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. Soluție de tiosulfat de sodiu 0,25N

62,5 grame tiosulfat de sodiu ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) se dizolvă în 750 ml apă distilată proaspăt fiartă și răcită. Se adaugă 3 ml hidroxid de sodiu 0,2N pentru stabilizare. Se aduce la 1000 ml cu apă distilată. Se standardizează față de bicromat de potasiu, iodat de potasiu sau permanganat de potasiu.

Modul de lucru

Se pipetează un volum de supernatant conținând catalază nu mai mare de 1 ml care să nu conțină mai mult de 3,5 U catalază, într-un vas gol de 200 ml. Se adaugă rapid o soluție de substrat de 100 ml apă oxigenată, adusă anterior la 25°C. Se agită imediat 5-10 secunde, se acoperă vasul cu hârtie de filtru sau sticlă de ceas, apoi se lasă la o parte la 25°C ± 3°C, până când reacția este completă.

Când reacția este completă se agită viguros timp de 5 secunde apoi, folosind o seringă sau o pipetă volumetrică, se transferă 4 ml din amestec într-un Erlenmayer de 50 ml, conținând 5 ml acid sulfuric 2N și se agită o dată pentru amestecare. Se adaugă 5 ml iodură de potasiu 40% și o picătură de molibdat de amoniu 1%.

Se titrează rapid la incolor cu tiosulfat de sodiu 0,25N agitând constant cu un agitator magnetic.

Proba martor se execută titrând 4 ml soluție apă oxigenată substrat la fel cum s-a procedat mai sus. Timpul de reacție depinde mult de sursa din care provine catalaza. În cazul catalazei din Aspergillus va fi necesar să se aștepte o oră pentru ca reacția să fie completă.

În cazul unei catalaze de origine necunoscută, o primă titrate se va face după 30 minute și următoarele la 10 minute interval până când 2 citiri consecutive coincid.

Rapiditatea este esențială în această determinare. Cu un substrat preparat proaspăt proba martor va fi în jur de 16 ml tiosulfat de sodiu 0,25N.

Calcul

$$U_{\text{catalaza Baker}}/\text{ml sau gram} = 0{,}4 \times (B - T) \times \frac{1}{C}$$

unde:

B – ml tiosulfat de sodiu 0,25N folosiți la titrarea probei martor;

T – ml tiosulfat de sodiu 0,25N folosiți la titrarea probei de analizat;

C – ml de soluție de enzimă din preparatul inițial adăugați la fiecare 100 ml apă oxigenată substrat sau, când se folosește 1 ml soluție de enzimă diluată, C este factorul de diluție.

8. DOZAREA ACTIVITĂȚII AMILOGLUCOZIDAZEI

Amiloglucozidaza este enzima care hidrolizează legăturile α,1–4 și α,1–6 glicozidice eliberând în mediul de reacție molecule de glucoză. Acțiunea amiloglucozidazei asupra polizaharidelor se numește zaharificare.

Metoda se bazează pe determinarea cantității de zahăr reducător (exprimat ca glucoză) rezultată în urma acțiunii amiloglucozidazei asupra unei soluții de amidon.

Definiția unității

O unitate de amiloglucozidaza este cantitatea de enzimă care eliberează 10 mg de zahăr reducător (calculat ca glucoză) din soluția de amidon solubil 2% în 10 minute la 42°C

Condiții standard

Temperatura: 60°C
pH: 5,6

Reactivi

1. *Soluție de amidon solubil 2%- soluția de substrat*

Se suspensionează în 20 ml apă distilată echivalentul a 2 g amidon solubil substanță uscată. Se toarnă suspensia obținută, sub agitare, în 50 ml apă distilată la fierbere și se fierbe 2-3 minute. Soluția este răcită și transferată într-un balon de 100 ml care se aduce la semn cu apă distilată.

2. *Soluție tampon acetat M/20*

Se prepară o soluție de acetat de sodiu 0,2 M. Într-un balon cotat de 100 ml se pun 9,5 ml acid acetic glacial și se completează la semn cu soluția de acetat. Din această soluție se iau 25 ml se aduc într-un balon cotat de 100 ml și se aduce la semn cu apă distilată.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. *Soluție de sulfat de cupru*

Se dizolvă 34,6 g sulfat de cupru în 500 ml apă distilată.

4. *Soluție de tartrat alcalin*

173g tartrat de sodiu şi potasiu (sare Rochelle) se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 500 ml. Separat se dizolvă 50 g hidroxid de sodiu în apă distilată, se amestecă cu soluția de sare Rochelle şi volumul se completează la 500 ml cu apă distilată.

5. *Soluție iodură de potasiu 30% proaspăt preparată* .

6. *Soluție acid sulfuric 25%*

133,5 ml acid sulfuric cu densitatea 1,84 se aduc la volum de 500 ml cu apă distilată.

7. *Soluție de tiosulfat de sodiu N/20 (0,05N)*

8. *Soluție de enzima*

Soluția de enzima se prepară astfel încât să corespundă condițiilor în care se desfăşoară dozarea. Diluția soluției se determina prin încercări atunci când nu se poate estima activitatea preparatului enzimatic testat.

Modul de lucru

Într-o eprubetă test de 30 mm diametru şi 250 mm înălțime se pipetează 3 ml soluție amidon solubil 2% peste care se adaugă 2 ml soluție tampon acetat M/20 de ph 5,6 şi eprubeta se introduce într-o baie de apă la 60°C unde se ține timp de 20 minute pentru termostatare. Se adaugă apoi 1 ml soluție de enzimă şi se lasă ca reacția să se desfăşoare timp de exact 10 minute temperatura fiind menținută cu precizie la 60°C. Reacția este stopată prin adăugare de 2 ml soluție alcalină de tartrat. Se adaugă apoi 2 ml de soluție de sulfat de cupru şi eprubeta este scufundată timp de 10 minute într-o baie de apă la fierbere. După răcire în curent de apă se adaugă 2 ml soluție de iodură de potasiu 30% şi 2 ml soluție acid sulfuric 25%.

Iodul pus în libertate este titrat cu soluție de tiosulfat de sodiu N/20.

Paralel cu proba se face şi un test martor în care se adaugă în locul soluției de enzimă, un ml de apă.

Calculul activității

Cantitatea de glucoză pusă în libertate sub acțiunea amiloglucozidazei asupra soluției de amidon solubil se calculează astfel:

mg glucoză = 1,6 × (ml soluție tiosulfat folosiți la proba martor – ml soluție tiosulfat folosiți la proba cu enzimă)

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

$$\text{Activitate amiloglucozidaza/ gram} = \frac{\text{mg glucoza} \times 1000}{10}$$

9. DOZAREA ACTIVITĂȚII PECTINAZEI MICROBIENE

Principiul metodei

Metoda se bazează pe măsurarea modificării vâscozității relative a pectinei-substrat ca urmare a hidrolizei legăturilor α–1,4–galacturonice din pectina sub acțiunea pectinazei.

Definiția unității

O unitate de activitate pectolitică este cantitatea de enzimă care reduce cu 50% vâscozitatea unei soluții de pectină 1% în timp de un minut la pH=5 și la temperatura de 30°C.

Reactivi

1. *Tampon citrat pH=5*

Se prepară o soluție de citrat din 21,014 g acid citric monohidrat ($C_6H_8O_7.H_2O$) și 200 ml hidroxid de sodiu 1M aduse la 1000 ml cu apă distilată. Soluția tampon citrat cu pH=5 se prepară amestecând 96 ml soluție citrat cu 4 ml soluție 0,1M hidroxid de sodiu.

2. *Pectina-substrat, soluție 1%*

Se utilizează pectină de măr, cu grad de esterificare 70%–75% și masă moleculară 25000-50000. Se cântărește 1 g pectină substanță uscată și se dizolvă, la cald, în 50 ml tampon citrat după care se aduce la 100 ml cu apă distilată.

Aparatura

1. Vâscozimetru tip Ubbelode, cu tub capilar nr. 2;
2. pH-metru, cu exactitate de 0,1 unități de pH;
3. Baie de apă termoreglabilă cu precizie de menținere a temperaturii de 0,1°C;

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. Balanța analitică;
5. Cronometre.

Modul de lucru

Pentru a lua temperatura de lucru, soluția de pectină-substrat și soluția de enzimă se mențin în baie de apă la 30°C timp de 10 minute.

Se introduc 20 ml pectină-substrat într-un pahar cilindric de 50 ml. Se adaugă 2 ml soluție de enzimă și se omogenizează rapid pornind, în același timp, cronometrul. Amestecul se toarnă rapid în vâscozimetrul introdus în baia de apă reglată la 30°C. Cu o pară de cauciuc fixată la partea superioara a tubului capilar al vâscozimetrului, se aspiră proba de analizat până deasupra reperului superior al acestuia, la următoarele intervale de timp: 1 minut, 3 minute și apoi din 3 în 3 minute ($T_1,T_3,...T_{30}$). Cu un alt cronometru, se măsoară timpul de curgere a probei, în secunde, între cele două repere ale vâscozimetrului ($t_1,t_3,....t_{30}$). Cu datele obținute, se trasează un grafic pe a cărui abscisă se reprezintă timpii de reacție în minute ($T1,T_3,...T_{30}$) și pe a cărui ordonată se reprezintă timpii de curgere prin capilar, în secunde ($t_1,t_3,...t_{30}$).

În paralel și în aceleași condiții se prepară o probă martor care conține 20 ml pectină-substrat și 2 ml apă distilată. Se măsoară timpul de curgere prin capilar al probei martor și se notează cu t_m.

De asemenea se execută o probă oarba prin măsurarea timpului de curgere prin capilar al unui volum de 22 ml apă distilată și se notează valoarea obținută cu t_a.

Calculul activității

Activitatea pectolitică, exprimată în unități pectolitice la un mililitru de enzimă, se calculează cu formula:

$$A_p = \frac{m \times f}{v \times T} \text{ U/ml}$$

unde:

m = cantitatea de pectină-substrat din cei 20 ml de soluție de substrat luați în lucru, în miligrame;

f = factorul de diluție a probei de enzimă;

v = volumul de soluție de enzimă luat în lucru;

T = timpul de reacție, determinat din grafic, corespunzător timpului de curgere a probei (t_p), la o vâscozitate de 50%, în minute.

T_p se calculează în felul următor:

$$V_r = \frac{t_m - t_p}{t_m - t_a} \times 100$$

unde:

V_r = vâscozitatea relativă;

t_m = timpul de curgere a probei martor, în secunde;

t_a = timpul de curgere a probei oarbe, în secunde;

Înlocuind V_r cu valoarea 50% şi t_m şi t_a cu valorile obținute în cursul analizei, se poate calcula t_p astfel:

$$t_p = \frac{t_m + t_a}{2}$$

Şi apoi se citeşte pe grafic valoarea T corespunzătoare acestuia.

10. DOZAREA ACTIVITĂȚII CELULOZOLITICE C_1 ÎN MEDII DE CULTURĂ ŞI PREPARATE CELULOZOLITICE

Majoritatea microorganismelor producătoare de celulaze de tip C_x produc şi cantități mai mici sau mai mari de celulază tip C_1

Aceste enzime transformă celuloza, în anumite condiții, în zaharuri reducătoare ca celobioză şi glucoză.

Ca metode pentru determinarea activității celulozolitice C_1 există metoda M. Mendels cu adaptări, pentru realizarea într-un laborator standard.

Principiul metodei

Se dozează colorimetric, cu ajutorul acidului 3,5-dinitrosalicilic (DNS), zaharurile reducătoare exprimate ca glucoză, eliberate prin hidroliza α–celulozei (Whatman nr. 1), în tampon citrat de pH= 4,5, la 50°C, timp de 2 ore, cu o soluție de celulaza tip C_1.

BCU IAŞI CULTURA UNIVERSITY LIBRARY

Definiția unității

Definiția unității celulozolitice C_1, conform metodei, este următoarea: o unitate celulozolitică C_1 reprezintă numărul de micromoli de glucoză eliberați de un mililitru de enzimă la 50°C, în timp de 2 ore, la pH=4,5.

Reactivi

1. *Soluția de enzimă*

Se folosesc filtrate sau supernatante de enzimă, diluate sau nediluate.

2. *Substratul*

Hârtie de filtru Whatman nr. 1 tăiată în șuvițe subțiri.

3. *Soluție de tampon citrat 0,05 M*

Se prepară din soluție de citrat de sodiu ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$) 0,1M și soluție de acid citric ($C_6H_8O_7H_2O$) 0,1M prin amestecare și diluare.

4. *Soluție de acid citric 0,1 M*

21,014 g acid citric se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml. Se aduce la semn cu apă distilată și se omogenizează prin agitare.

5. *Soluție citrat de sodiu 0,1 M*

29,413 g citrat de sodiu se dizolvă în apă distilată într-un balon cotat de 1000 ml. Se aduce la semn cu apă distilată și se omogenizează prin agitare.

Se amestecă 40 ml soluție de acid citric 0,1 M cu 60 ml soluție citrat de sodiu 0,1 M rezultând 100 ml soluție tampon citrat 0,1 M cu pH=4,5. Se iau 50 ml soluție tampon citrat 0,1 M cu pH=4,5 și se amestecă cu 50 ml apă distilată. Rezultă 100 ml soluție tampon citrat 0,05 M cu pH=4,5.

6. *Soluție acetat de plumb 10%*

10 g acetat de plumb se dizolvă în apă distilată iar volumul se aduce la 100 ml.

7. *Soluție hidroxid de sodiu 10%*

10 g hidroxid de sodiu se dizolvă în apă distilată iar volumul se aduce la 100 ml.

8. *Solutie etalon de glucoză 0,1% (1 mg/ml)*

Se cântăresc cu precizie analitică 0,1 g glucoză (reactiv pentru analiză) şi se aduc cu apă distilată la100 ml.

9. *Reactiv 3,5-dinitrosalicilic (DNS)*

10 g acid dinitrosalicilic, recristalizat proaspăt din apă, se amestecă într-o capsulă cu aproximativ 30 ml apă distilată. Se trece cantitativ conținutul capsulei într-un balon cotat de 1000 ml clătindu-se capsula cu încă 50 ml apă şi se trece balonul pe o baie de apă la fierbere până ce întreaga cantitate de substanță se solubilizează.

Paralel se pregăteşte o soluție de hidroxid de sodiu de 16 g în 200 ml apă şi o soluție de tartrat dublu de sodiu şi potasiu de 300g în 500 ml apă.

Ambele soluții se introduc pe rând în soluția încă caldă de acid DNS. După răcire se completează la semn cu apă distilată şi se omogenizează prin agitare. Soluția se lasă în repaos 24 ore.

Dacă apare un precipitat acesta se separă prin filtrare.

Se păstrează soluția astfel preparată în loc uscat, răcoros, de preferință în sticle de polietilenă etanş închise.

Aparatura

– Baie termostat reglată la 50°C ± 0,05°C;
– Baie de apă electrică;
– Fotocolorimetru Spekol;
– Cronometru;
– Creuzete filtrante $3G_2$;
– Eprubete cu pereți groşi cu marcaj de 20 ml.

Mersul determinării

Hidroliza enzimatică

Prepararea amestecului de reacție cu proba de analizat

Într-o eprubetă de 2,5/25 cm se introduc 50 mg hârtie de filtru Whatman nr. 1, tăiată în fâşii subțiri, 4 ml tampon citrat 0,05 M cu pH=4,5 şi 4 ml soluție de enzimă (mediu filtrat).

Eprubeta cu mediul de reacție se preincubă la 50°C timp de 15 minute pentru a lua temperatura băii. Incubarea durează 2 ore la 50°C, timp în care eprubeta se agită din când în când.

BCU "ION CREANGĂ" LIBRARY

Stoparea reacției enzimatice și defecarea se fac adăugând 4 ml soluție acetat de plumb 10%, după care se lasă 10 minute pentru sedimentare. Se filtrează prin filtru cutat, filtrul folosindu-se pentru determinarea zahărului reducător.

Paralel cu proba de cercetat se execută, în aceleași condiții, o probă martor (blanc) fără hârtie de filtru, pentru a determina zahărul reducător prezent în preparatul enzimatic.

Determinarea zaharurilor reducătoare ca glucoză cu ajutorul acidului 3,5-dinitrosalicilic (DNS)

Principiul metodei

În mediu alcalin, grupa carbonilică a mono-, di-, oligo- și polizaharidelor este oxidată la grupa carboxil de către acidul 3,5-dinitrosalicilic iar o grupă nitro a acidului DNS se reduce la amină. Acidul DNS rezultat, colorat de la galben la roșu-maroniu, în funcție de cantitatea de zahăr reducător prezent, se determină colorimetric.

Mersul determinării

Într-o eprubetă calibrată cu pereți groși, se pun 2 ml probă de analizat și în alta similară, 2 ml probă martor. Se aduce la pH=8-8,5 cu câteva picături (5) de hidroxid de sodiu 10% și se adaugă câte 2 ml soluție DNS în fiecare eprubetă. Se agită și se introduc eprubetele timp de 10 minute în baia de apă la fierbere pentru dezvoltarea culorii. După răcire, ambele eprubete se aduc la 10 ml cu apă distilată.

Soluțiile astfel pregătite, proba și martor, sunt gata pentru colorimetrare.

Pentru determinarea intensității coloratiei produse se citește extincția la fotocolorimetru în cuve de 1 cm grosime a stratului de lichid, la lungimea de undă de 535 nm. Extincția se citește față de apa distilată. Valoarea extincției probei martor se citește în aceleași condiții și se scade din valoarea extincției probei de analizat. Apoi se citește pe curba etalon conținutul de glucoză corespunzător diferenței de extincție între probă și martor care reprezintă zahărul rezultat prin hidroliza enzimatică.

Trasarea curbei de etalonare

Pentru stabilirea curbei de etalonare, se pipetează, într-o serie de eprubete în care se găsesc câte 20 ml reactiv DNS, soluțiile indicate mai jos:

Soluție etalon (soluție glucoza 0,1%)	Apa distilata	Conținut în glucoza în mg
0,0	2,0	0,0
0,1	1,9	0,1
0,2	1,8	0,2
0,3	1,7	0,3
0,4	1,6	0,4
0,5	1,5	0,5
0,6	1,4	0,6
0,7	1,3	0,7
0,8	1,2	0,8
0,9	1,1	0,9
1,0	1,0	1,0

Adăugarea reactivilor şi operaţiile ulterioare se fac în modul care a fost descris la determinarea zahaăului reducător în proba de analizat.

După determinarea extincţiilor faţă de apa distilată acestea sunt trecute într-un grafic pe ordonată iar pe abscisă sunt înscrise concentraţiile de glucoză corespunzătoare. Prin unirea punctelor astfel obţinute rezultă curba etalon care, dacă este corect executată, trebuie să reprezinte o linie dreaptă.

Observaţie

- la pregătirea soluţiilor pentru colorimetrare, după încălzire, probele se pot păstra numai în stare nediluată şi nu mai mult de o oră;
- dacă proba este mai mică de 2 ml atunci volumul se aduce cu apă la 2 ml astfel că amestecul de reacţie cu DNS să fie întotdeauna de 4 ml.

Calcularea activităţii celulozolitice C_1

După cum s-a mai spus, activitatea celulozolitică C_1 se defineşte astfel: numărul de microlitri de glucoză eliberaţi de 1 ml preparat enzimatic la 50°C, timp de 2 ore, la pH=4,5.

Se presupune că la determinarea fotocolorimetrică s-au obţinut următoarele rezultate:

$E_p = 0,30$; $E_m = 0,15$ în care:

E_p – extincţia probei de cercetat + extincţia martorului;

E_m – extincția martorului (zahărul existent în mediul enzimatic);

$E_p - E_m$ = extincția corespunzătoare probei de analizat (zahărul reducător rezultat în urma hidrolizei enzimatice).

Înlocuind cu valorile obținute avem: 0,30 – 0,15 = 0,15

Pentru valoarea extincției de 0,15 pe curba etalon corespunde o cantitate de glucoză de 0,15 mg.

Conform metodei, pentru determinare s-au luat în lucru 4 ml preparat enzimatic. Ținând cont de diluțiile care s-au făcut în timpul determinării, aflăm cantitatea de enzimă care a eliberat prin hidroliză 0,15 mg glucoză, astfel:

4 ml au fost aduși la 12 ml (+ 4 ml tampon + 4 ml acetat de plumb). Pentru colorimetrare s-au luat în lucru 2 ml (din cei 12 ml de mai sus) și s-au adus în volum de 10 ml (conform metodei).

Volumul de enzimă care a eliberat prin hidroliză 0,15 mg glucoză va fi: 4/6 ml (0,666 ml) deci: 0,15 mg glucoză sunt eliberați de 0,666 ml preparat enzimatic. Aplicând regula de trei simplă, rezultă că 1 ml preparat enzimatic va elibera 0,225 mg glucoză sau 225 micrograme glucoză. Cunoscând că greutatea moleculară a glucozei este 180 se calculează activitatea celulozolitică C_1 după formula:

$$UC_1 = \frac{225}{180} = 1{,}25 \text{ micromoli glucoza/ml enzima în 2 ore la 50°C și pH=4,5}$$

11. DOZAREA ACTIVITĂȚII β-GLUCANAZEI DUPĂ ABM CHEMICAL LTD.

Principiul metodei

Enzima reacționează cu substratul de β-glucan (sau lichenina) timp de 10 minute și grupările terminale reducătoare se determină colorimetric cu ajutorul acidului dinitrosalicilic (DNS).

Definirea unității

O unitate β-glucanaza în condițiile metodei, este activitatea preparatului enzimatic care produce, prin hidroliza β-glucanului, 1 mg zaharuri reducătoare exprimate ca maltoză, pe minut și pe gram de enzimă.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reactivi

Soluţia de substrat

1,0 g β-glucan (lichenină) standard se dizolvă în apă distilată (aproximativ 80 ml), se încălzeşte pe baie de apă la fierbere, se răceşte, se adaugă 10 ml tampon acetat 1M cu pH= 5 şi se aduce la volum de 100 ml.

Soluţia de tampon acetat

Se amestecă 70 ml acetat de sodiu 1M şi 30 ml acid acetic 1M. Soluţia obţinută are pH=5.

Soluţia de acid dinitrosalicilic (DNS)

1 g acid dinitrosalicilic se adaugă la 16 ml soluţie 10% hidroxid de sodiu m/v şi 30 g tartrat dublu de sodiu şi potasiu tetrahidrat. Se adaugă 50 ml apă distilată, se încălzeşte pentru dizolvare, se răceşte şi se aduce la volum de 100 ml. Este valabil timp de 5 zile dacă se păstrează la 5°C.

Modul de lucru

1 ml soluţie de substrat se pipetează într-o eprubetă şi se introduce într-o baie de apă la 50°C timp de 5 minute pentru termostatare. Se adaugă apoi 1 ml enzimă diluată, se lasă să reacţioneze 10 minute după care se adaugă 2 ml reactiv DNS.

Se execută o determinare martor prin adăugarea reactivului DNS înaintea soluţiei de enzimă, la substrat. Se pun ambele eprubete într-o baie de apă la fierbere pentru 5 minute, se răceşte după care se adaugă 10 ml apă distilată.

Se citeşte intensitatea coloraţiei formate faţă de martor folosind cuve de 20 mm la lungimea de undă de 540 nm.

Calculul activităţii

Se construieşte o curbă etalon de maltoză standard folosind o soluţie care conţine între 0,2 şi 1 mg maltoză/ml.

O.D.	mg maltoză
0,16	0,2
0,325	0,4
0,490	0,6
0,655	0,8
0,820	1,0

BCU IAŞI - CELAL UNIVERSITY LIBRARY

Se construieşte o curbă standard pentru β-glucanază preparând o serie de diluţii enzimatice, se execută experienţa şi se găseşte concentraţia enzimei necesară pentru producerea a 0,4 mg maltoză.

Exemplu de calcul

Pentru diferite concentraţii ale enzimei s-au obţinut următoarele densităţi optice:

concentraţia enzimei%	O.D.
0,01	0,16
0,02	0,30
0,04	0,52
0,06	0,66
0,08	0,77

Pentru graficul de mai sus o soluţie de 0,022 % de enzimă dă o densitate optică de 0,325 ceea ce corespunde la 0,4 mg maltoză.

$$U_{\beta\text{-glucanaza}} \frac{1000}{0,22} \text{ mg} \times \frac{0,4}{10} = 182 \text{ U/g}$$

– 0,22 mg reprezintă cantitatea de enzimă luată în reacţie (1 ml din soluţia 0,022%)

– 10 este timpul de reacţie şi pentru ca activitatea enzimei se măsoară pe minut se împarte la10.

Fiind determinată activitatea probei standard, se construieşte un grafic pentru o diluţie fixa de enzimă folosindu-se densitatea optică faţă de activitatea enzimei. Enzima folosită pentru calibrare este de 182 U/g.

Se foloseşte pentru calibrare o diluţie standard de 0,02%; aceasta, prin definiţie, trebuie să conţină 182 U/g. Deci alte diluţii trebuie să conţină un număr proporţional de unităţi. Aceste unităţi pot fi trecute pe grafic faţă de densitatea optică corespunzând la aceste concentraţii.

Concentraţia enzimei	Densitatea optică	Număr de unităţi
0,01	0,16	91
0,02	0,30	182

0,04	0,52	364
0,06	0,66	546
0,08	0,77	728

Exemplu:

Diluția enzimei; 0,025 %
Densitatea optică: 0,250
Citire pe grafic: 150 U/g

$$U_{\beta\text{-glucanaza}} = 150 \times \frac{0,02}{0,025} = 120 \text{ U/g}$$

Pentru rezultate foarte exacte se prepară o curbă standard pentru fiecare probă şi se extrapolează cantitatea de enzimă necesară a da 0,4 mg maltoz (O.D.= 0,325) cum s-a descris mai sus.

12. DOZAREA ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI

Principiul metodei

Metoda se bazează pe hidroliza soluției de amidon cu enzime. Formarea culorii albastre cu iodul este folosită pentru urmărirea reacției. În timpul hidrolizei amidonului această culoare devine mai slabă şi în mod gradat se schimbă în roşu maroniu. Nuanța finală este comparată cu o soluție de colorație standard.

Metoda diferă de metoda originală SKB prin tipul de amidon folosit ca substrat, prin temperatură şi pH-ul la care se desfăşoară reacția enzimatică şi prin faptul că nu se adaugă β-amilază. Folosirea metodei este indicată pentru preparatele enzimatice care nu conțin β-amilază (de exemplu amilază bacteriană).

Definiția unității

O unitate α–amilază Novo este cantitatea de enzimă care, în condițiile metodei, hidrolizează 5,26 mg amidon pe oră.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Condiții standard

Temperatura: 37° ± 0,05°C
Concentrația ionilor de calciu: 0,0043M
pH: 5,6 – 5,9

Aparatura

Baie termostat reglată la 37°C + 0,05°C
Bec 40 w mat
Agitator magnetic

Reactivi

1. *Soluție de clorură de calciu 0,43 M cu pH= 7,0*
Se prepară prin dizolvarea a 63,22 g $CaCl_2$.$2H_2O$ și a 1,21g Tris (hidroximetilaminometan) în 900 ml apă distilată; se reglează pH-ul la 7,0 cu acid clorhidric 4N (aproximativ 3 ml) și se completează la 1000 ml cu apă distilată

2. *Soluție de iod A (soluție stoc)*
22,0 g KI
11,0 g I_2.

Iodura de potasiu se dizolvă în 60 ml apă distilată, se adaugă iodul cristale și se agită până la dizolvare. Se adaugă apoi apă distilată până la 500 ml.

3. *Soluție de iod B (soluție de lucru)*
4,0 ml soluție de iod A
40 g KI
Apă distilată până la 1000 ml

4. *Soluție de clorură de sodiu în tampon fosfat*
9,36 g NaCl
63,0 g KH_2PO_4
4,80 g $Na_2HPO_4.2H_2O$
Apă distilată până la 1000 ml
pH-ul soluției este 5,2

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. *Soluție de amidon (substrat)*

Se face, în prealabil, determinarea umidității amidonului. Se folosește amidon solubil Merck. După determinarea umidității se cântărește cantitatea de amidon care conține 6,95 g substanță uscată și se face o suspensie în 100 ml apă distilată. Suspensia de amidon se transferă cantitativ, sub agitare, intr-un pahar cu 200 ml apă distilată la fierbere. Soluția se fierbe 1-2 minute și apoi se răcește la temperatura camerei. Soluția se transferă cantitativ într-un balon cotat de 1000 ml și se adaugă 100 ml soluție de clorură de sodiu în tampon fosfat (soluția 4), se adaugă 2-3 picături de toluen și se completează la 1000 ml cu apă distilată. pH-ul soluției astfel preparate trebuie să fie 5,6. Soluția de substrat trebuie preparată proaspăt de câte ori se efectuează o determinare. Poate fi folosită pe parcursul unei singure zile.

6. *Soluția de enzimă*

Pentru prepararea soluției de enzimă se folosește apă deionizată și soluție de clorură de calciu (soluția 1). Prima care se adaugă în balon este soluția de clorură de calciu după care se adaugă preparatul de enzimă. Diluțiile sunt calculate astfel încât prin folosirea, în reacție, a 2 ml, 5 ml și 10 ml soluție de enzimă să se obțină un timp de reacție de 7 până la 20 de minute.

Conținutul de calciu în soluția de enzimă corespunde la aproximativ 24 grade duritate.

Enzimele în stare solidă trebuie agitate cel puțin 30 minute pentru dizolvare.

7. *Soluția comparator de culoare*

19,25 g $CoCl_2 . 6H_2O$

2,567 g $K_2Cr_2O_7$

2,565 g $CuSO_4.5H_2O$

Se dizolvă substanțele în HCl 0,01 N și se aduce la balon cotat de 100 ml.

Modul de lucru

Se pipetează într-un tub test (25×200 mm) 20,0 ml soluție amidon și n ml apă deionizată (numărul mililitrilor de apă deionizată care se adaugă depinde de numărul mililitrilor de soluție de enzimă ce vor fi adăugați astfel încât volumul final să fie de 30 ml). Se introduce tubul test într-o baie termostat reglată la 37°C timp de aproximativ 10 minute. De asemenea,

soluţia de enzimă ce urmează a fi folosită se termostatează la 37°C prin introducerea unei eprubete cu soluţie de enzimă în baia termostat.

Se adaugă în eprubeta test cu soluţie de amidon (10–n) ml soluţie de enzimă preîncălzită la 37°C şi se amestecă prin suflare în pipeta cu care s-a adăugat enzima. Se porneşte cronometrul. La interval de 7 minute se ia 1 ml amestec de reacţie şi se adaugă într-o eprubetă cu 5,0 ml soluţie iod B. Se compară culoarea obţinută cu cea a soluţiei comparator de culoare aflată într-o eprubetă identică şi în aceeaşi cantitate (5ml+1 ml), la lumina unui bec mat de 40 w. Când cele două culori sunt identice reacţia este completă şi se notează timpul exact în minute. Timpul de reacţie care se măsoară din momentul amestecării soluţiei de enzimă cu soluţia de amidon este determinat cu o precizie de 15 secunde şi, pentru ca rezultatul să fie corect, ar trebui să se încadreze în intervalul 7-20 minute. Dacă timpul este sub 7 minute, soluţia de enzimă este prea concentrată şi vor mai trebui făcute diluţii iar dacă timpul de reacţie este mai mare de 20 minute soluţia de enzimă este prea diluată şi se va repeta determinarea cu o soluţie mai concentrată.

Calculul activităţii

$$U_{\alpha amilaza} = \frac{Factor_{amidon} \times V}{t \times a \times v}$$

unde:

a – cantitatea de enzimă în grame;
V – volumul în ml de soluţie în care s-au dizolvat a g enzimă;
v – soluţia de enzimă în ml luată în lucru;
t – timpul de reacţie în minute.

Factorul amidonului depinde de amidonul folosit. Când se foloseşte un nou amidon, dacă acesta nu este identic cu cel folosit anterior, trebuie calculat un nou factor precum şi o nouă cantitate de amidon hidrolizat/oră.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ablkhail, B., Shawky, S. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 53, 6, 519-528, 2002.
2. Alba S., Humphrey, S. şi Milles, F. *Biochemical engineering*, ed. 2, Academic Press, New York, 1973.
3. Alexandru, R., Zara, M., Sîrbu, A., *Bioethical reflection on consume 's protection as social protection component in România in transition*, 4th Congress of the European Society for Agricultural and Food Ethics, Eursafe, Toulouse- Franța, 19-22 martie, 2003
4. Bana, C., ş.a., 2000, *Biotehnologii în industria alimentară*, Ed. Tehnică, Bucureşti.
5. Blakebrough, N., *Biochemical and engineering science*, vol. I şi II, editura Academic Press, New York, 1968.
6. Cantarelli, C. (1984). Enzimi per l'industria alimentare, *Industrie Alimentari*, 845-852.
7. Capewell, A., Wendel, V., Bornscheuer, U., Meyer, H.H., Scheper, T. (1996). Lipasecatalyzed kinetic resolution of 3-hydroxy esters in organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Enzyme Microb. Technol*, 19, 181-186.
8. CAPRA F. (2004). *Momentul adevărului*, ed. Tehnică, p. 572, Bucureşti
9. Caraman, S., Creangă, E., Frangu, L., Mencinicopski, Gh., *Modelarea şi conducerea proceselor biotehnologice*, Editura didactică şi pedagogică, Bucureşti, 2002, 263 p.
10. Carpov, S., 1997, *Tehnologia generală a industriei alimentare*, Ed. I.E.P., Chişinău şi Ed. Tehnică. Bucureşti.
11. Carta, G., Gainer, J.L., Benton, A.H. (1991). Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. *Biotehnol .Bioeng.* 37, 1004-1009.
12. Carta, G., Gainer, J.L., Gibson, M.E. (1992). Synthesis of esters using a nylonmmobilized lipase in batch and continuous reactors. *Enzyme Microb. Technol* 14 904-909.
13. Cornea, C.P., 2002, *Inginerie genetică. Principii de realizare. Aplicaţii. Aspecte economice şi etice*, Edit. Printeh Bucureşti
14. Corplan, S., Green, R., Rocco, J., Kurjan, J., *J. Bacteriol*, **173**, 627-635, (1991).
15. CORTHESY – THEULAZ, I., DEN DUNNEN, J.T. FERRE, P., GEURTS, J.M.W., MULLER, M., VAN BELZEN, N., AND VAN OMMEN, B (2005).

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

Nutrigenomics: The Impact of Biomics Technology on Nutrition Research. Ann Nutrition Research. Ann Nutr. Metab. 49, 355 – 365.

16. Cosim, Gh.M., ş.a., 1985, *Valorificarea subproduselor din industria laptelui*, Ed. Tehnică, Bucureşti.
17. Cristea, A. ş.a. *Procese bioenergetice şi oxidoreducerea enzimatică,* Bucureşti, Editura Ştiinţifică, 1973.
18. Cruces, M.A., Otero, C, Bernabe, M., Martin-Lomas, M., Ballesteros, A. (1992). Enzymatic preparation of acylated sucroses, în *Enzyme Engineering XI, Annals of the New York Academy of Sciences,* **Vol. 672,** New York, 436-443.
19. Cygler, M., Grochulski, P., Schrag, J.D. (1995). Structural determinants defming common stereoselectivity of lipases toward secondary alcohols. *Can. J. Microbiol.* 41(suppl. 1), 289-296.
20. Dan, Valentina, 1999, *Microbiologia produselor alimentare*, Ed. Alma, Galaţi, vol. 1.
21. Dan, Valentina, ş.a., 1985, *Îndrumar de lucrări practice la microbiologie*, Ed. Universitatea din Galaţi.
22. Dan, Valentina, ş.a., 1999, *Memorator drojdii*, Ed. Evrika, Brăila.
23. De Renobales, M., Agud, I., Lascary, J.M., Mugica, J.C., Landeta, L.C., Solozabal, R. (1992). Hydrolysis of animal fats by lipase at temperatures below their melting points. *Biotechnol Lett.* 14, 683-688.
24. De Santis, G., Jones, J.B. (1999). Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Curr. Opin. Biotechnol,* 10, 324-330.
25. Dekker, M., *Immobilized enzymes, antigenes, antibodies andpeptides. Preparation and characterizatien,* Editura Weetal H. H., vol. I, New York, 1975.
26. Deleuze, FL, Langrand, G., Millet, H., Baratti, J., Buono, G., Triantaphylides, C. (1987). Lipasecatalyzed reactions in organic media: competition and applications. *Biochim. Biophys. Acta,* **911,** 117-120.
27. Demain, A., Davies J., Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999, ASM Press, Washington DC.
28. Demain, L., *Theoretical and applied aspects ofEniyme regulation and biosynthesis in microbial cells,* Biotechnol, Symp. 3,1972.
29. DeMoraes, J., Chandan, R.C. (1982). Factors influencing the production and activity of *Streptococcus thermophilus* lipase. *J.FoodSci.,* 47,1579-1583.
30. Dibkaer, R. (2002). The tortuous road to the adoption of katal for the expression of catalytic activity by the
31. Egri, G., Bálint, J., Peredi, R., Fogassy, E., Novák, L., Poppe, L. (2000). Lipase-catalyzed enatiotope selective acetylation of 2-acyloxypropane-l,3-

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

diols. Infiuence of the acyl moiety on the selectivity. *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **10**, 583-596.

32. ELLIOT, R., ONG., T.J. (2002). *Nutritional genomics*. BMJ 324, 1438 – 42.
33. Emanuel, N. Knorre, D., *Cinetique chimique,* Moscova, editura Mir, 1975.
34. Engel, P.C. (1981). *Enzyme Kinetics. The Steady-State Approach,* Ediția a 2-a, Chapman and Hali, London.
35. Erikson, P., Andre, L., Ansell, R., Blamberg, A., Adler, L., *Mol. MicrobioL,* **17**, 95-107, (1995).
36. Erlanson-Albertsson, C, Akerlund, H.E. (1982). Conformarional change in pancreatic lipase induced by colipase *FEBS Lett.,* 144, 38-42.
37. Faber, K. (1995). *Biotransformations in Organic Chemistry,* Ediția a 2-a, Springer-Verlag, Heidelberg.
38. Fregrapane, G, Sarney, D.B., Greenberg, S.G., Knight, D.J., Vulfson, E.N. (1994;. Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with convențional products. *J. Am.Oil Chem. Soc.* 71, 87-91.
39. Fregrapane, G., Samey, D.B., Greenberg, S.G., Knight, D.J., Vulfson, E.N. (1992). Chemo-enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their preliminary characterisation, în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor Tramper J. ş.a.), *Progress in Biotechnology,* **Vol. 8**, Elsevier, Amsterdam, 563-568.
40. Fregrapane, G., Sarney, D.B., Vulfson, E.N. (1991). Enzymic solvent-free synthesis of sugar acetal fatty acid esters. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 796-800.
41. Gaden, E., şi Humphrey, A., *Single Cell Protein from Renewable andNonrenewable Reseures,* New York, John Willwy & Sons, 1977.
42. Galzy, P., ş.a., 1996, *Ind. Alim. Agr.,* Septembrie, 656-662.
43. Gerlach, D., Lutz, D., Mey, B., Schreyer, P. (1989). Enantioselective lipase catalyzed esterification in organic medium for preparation of opticâlly active secondary alcohols. Z *Lebensm. Unters. Forsch.,* **189**,141-143.
44. GH. MENCINICOPSCHI, GH. ZARNEA, I. DAVID, ŞT. BRĂGĂREA – *Biotehnologii Alimentare* – volumul I şi II, 837 pg., Editura Mirton, Timişoara, 2008
45. Ghoshray, S., Battacharya, D.K. (1992). Enzymatic preparation of ricinoleic acid esters of long-chain monohydric alcohols and properties of the esters. *J. Am. OIL Chem. Soc,* 69, 85-89.
46. Gill, I. (2001). Bio-doped nanocomposite polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chem. Mat.,* **13**, 3404-3421.
47. Gill, I., Ballesteros, A. (2000). Bioencapsulation within synthetic polymers (Part I): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol.,* **18**, 282-296.

BCU TIMIŞOARA LIBRARY

48. Gill, I., Pastor, E., Ballesteros, A. (1999). Lipase-silicon biocomposites: efficient and versatile immobilized biocatalysts. *J. Am. Chem. Soc,* **121,** 9487-9496.

49. Giuseppin, M.L.F. (1984). Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delemar. Appl. Microbiol. Biotechnol,* 20, 161-165.

50. Gololobov, M.Y., Voyushma, T.L., Stepanov, V.M., Adlercreutz, P. (1992). Organic solvent changes the chymotrypsin specificity with respect to nucleophiles *FEBS Lett.,* **307**, 309-312.

51. Gorman, L.A.S., Dordick, J.S. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng,* **39**, 392-397.

52. Gregoriadis, G., Leathwood, P.D., Ryman, B.E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.,* **14**, 95-99.

53. Han, D., Rhee, J.S., Lee, S.B. (1987). Lipase reaction in AOT-isooctane reversed micelles: effect of water on equilibria. *Biotechnol. Bioeng.,* **30**, 381-388.

54. Hansen, T.V., Waagen, V., Partali, V., Antonsen, H.W., Anthonsen, T. (1995). Cosolvent enhancement of enantioselectivity in lipase-catalysed hydrolysis of racemic esters. A process for production of homochiral C-3 buiding blocks using lipase B from *Candida antarctica. Tetrahedron: Asymmetry,* **6**, 499-504.

55. Hata, Y., Matsuura, Y., Tanaka, N., Kakudo, M., Sugihara, A., Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1979). Low resolution crystal structure of lipase from *Geothricum candidum* (ATCC34614). *J. Biochem.,* **86**, 1821-1827.

56. Hayes, D.G., Gulari, E. (1991). 1-Monoglyceride production firom lipase-catalyzed esterification of giycerol and fatty acid in reverse micelles. *Biotechnol. Bioeng.,* **38**, 507-517.

57. Headerson, W, *Continuans Culture of Microorganism,* S.C.I. Monograph, No. 12, London, Society of Chemical Industry, 1961.

58. Hench, L.L., West, J.K. (1990). The sol-gel process. *Chem. Rev.,* **90**, 33-72.

59. Herăscu L.M, Rădoi F., *Microbiologie specială.* A.M.D. Bucureşti, 2002.

60. Herlea V., *Microbiologie*, 1998, Ed. Univ. Bucureşti

61. Hills, M.J., Kiewitt, I., Mukherjee, K.D. (1990a). Lipase from *Brassica napus* L. discriminates against *cis-4* and *cis-6* unsaturated fatty acids and secondary and tertiary alcohols. *Biochim. Biophys. Acta.* **1042,** 237-240.

62. Hills, M.J., Kiewitt, L, Mukherjee, K.D. (1989). Enzymatic fractionation of evening primrose oil by rape lipase: enrichment of y-linolenic acid. *Biotechnol. Lett.,* **11**, 629-632.

63. Hills, M.J., Kiewitt, L, Mukherjee, K.D. (1990b). Enzymatic fractionation of fatty acids: enrichment of y-linoleic acid docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. *J. Am. OIL Chem. Soc.* **67**, 561-564.

64. Hilt, W., Wolf, D. H., *Molecular Microbiology,* **6**, 2437-2442, (1992).

65. Hinnen, A., Buxton, F., Chandhuri, B., Hein, I., Hottinger, T., Meyhack, B., Pohlig, G., *Gene expression in recombinant micro-organism,* A. Smith, Marcel Dekker Inc., New York, 121-193, (1995).

66. Hulse, J.H. (2004). Biotechnologies: past history, present state and ftiture prospects. *Trends Food Sci. Technol,* **15**, 3-18.

67. Ikeda, L, Klibanov, A.M. (1993). Lipase-catalyzed acylation of sugars in hydrophobic solvents by complexation. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 788-791.

68. Iwai, M., Tsujisaka, Y. (1974). The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar. Agr. Biol. Chem.,* 38, 1241-1247.

69. Jaeger, K.H., Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol., **16**, 396-403.

70. Jensen, P. R., Snoep, J. L., Westerhoff, H. V., *PCT International publication* no WO **98/10089,** (1998).

71. Jensen, R.G, Galuzzo, D.R., Bush, V.J. (1990). Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases). *Biocatalysis,* **3**, 307-316.

72. Jin, W., Brennan, J.D. (2002). Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta,* **461,** 1-36.

73. Jurcoane, S., C.P. Cornea, T. Vassu, 2006, *Tratat de biotehnologie*, Volumul 2, Editura Tehnică Bucureşti

74. Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A., Klyachko, N., Martinek, K. (1988). Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Era. Microb. Technol.*, **10,** 710-724.

75. Khmelnitsky, Y.L., Zharinova, I.N., Berezin, I.V., Levashov, A., Martinek, K. (1987). Detergentless microemulsions. A new microheterogeneous medium for enzymatic reaction. *Enzyme Engineering 8,* (editori Laskin, A.I., Mosbach, K., Thomas, D., Wingard, L.B.J.) New York Academy of Science, New York, 161-164.

76. Kierstan, M., Bucke, C. (1977). The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 387-397.

77. Kilara, A., Shahani, K.M. (1979). The use of immobilized enzymes in the food industry: areview. *CRC Crit. Rew. Food Sci. Nutr.,* 161-198.

78. Kimura, Y., Tanaka, A., Sonomoto, K., Nihira, T., Fukui, S. (1983). Application of immobilized lipase to hydrolysis of triacylglyceride. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol,* **17**,107-112.

BCU

79. Kirchner, G., Scollar, M.P., Klibanov, A.M. (1985). Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc,* **107,** 7072-7076.

80. Kjeldsen, T., Hach, M., Petterson, A.F., Markussen, J., *Protein Expr. Purif,* 14, 309-316,(1998).

81. Kjeldsen, T., Petterson, A.F., Hach, M., Diers, I., Hansen, P.M., Andersen, A.S., *Protein Expr. Purif* 9, 331-336, (1997).

82. Klein, C.J.L., Olsson, L., Ronnow, B., Mikkelsen, D.J., Nielsen, J., *Food Technol. BiotechnoL,* 35, 287-292, (1997).

83. Klein, C.J.L., Olsson, L.L., Nielsen, J., *Enzyme Microb. Technol,* 23, 91-100, (1998).

84. Klein, C.J.L., Rasmunsen, J.J., Ronnow, B., Olsson, L., Nielsen, J., *J. BiotechnoL,* **68,** 197-212, (1999).

85. Klempier, N., Faber, K., Griengl, H. (1989). Biocatalytic preparation of enantiomerically pure endo-bicyclo[3.2.0]oct-7-en-2-ol. *Synthesis,* **12,** 933-934.

86. Klibanov, A.M. (1990). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Ace. Chem. Res.,* **23,** 114-120.

87. Klibanov, A.M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature,* **409,** 241-246.

88. Kokusho, Y., Machida, H., Iwasaki S. (1982). Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. străin No. 679. *Agr. Biol. Chem.,* **46,** 1159-1164.

89. Kosaric, N., Zajic, J.E., Aboue, G., Jack, T., Gerson, D. (1979). Lipase synthesis in hydrocarbon fermentation. *Biotechnol. Bioeng.,* **21,** 1133-1149.

90. Kuhl, P., Halling, P.J. (1991). Salt hydrates buffer water activity during chymotrypsin catalysed peptide synthesis . *Biochim. Biophys. Acta,* **1078,** 326-328.

91. Kutzman, C.P., *Methods Enzymol,* **224,** 335-348, (1993).

92. Kvittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., Halling, P.J. (1992). Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalysed synthesis in organic media: a practicai procedure for organic chemists. *Tetrahedron,* **48,** 2793-2802.

93. Kvittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., Halling, P.J. (1992). Salt hydrates to buffer optimal water level dunng lipase catalysed synthesis in organic media: a practical procedure for organic chemists. *Tetrahedron,* **48,** 2793-2802.

94. Laane, C, Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987). Optimization of biocatalysis in organic media, în *Biocatalysis in organic media* (editori Laane, C, Tramper, J., Lilly, M.D.), Elsevier, Amsterdam, 65-84.

95. Laane, C., Tramper, J., Lilly, M.D. (editori) (1987). *Biocatalysis in Organic Media,* Elsevier, Amsterdam. Ladner, W.E., Whitesides, G.M. (1984). Lipase catalyzed hydrolysis as a route to esters of chiral epoxy alcohols. *J. Am. Chem. Soc,* **106,** 7250-7251.

96. Lagocki, J.W., Law, J.H., Kezdy, F.J. (1973). The kinetic study of enzyme action on substrate monolayers. *J.BiolChem.,* **248,** 580-587.

97. Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J. (1988). Lipase catalyzed formation of flavour esters. *Biotechnol. Lett.,* **10,** 549-554.

98. Larpent, M., Gourgand, J.J. Sanglier, 1992, *Biotechmoiogies Principes at Methodes,* Paris.

99. Lazar, G. (1985). Estersynthesen mit Iipasen. *Fette, Seifen, Anstrichmittel,* **87,** 394-400.

100. Lehninger A.L., *Biochimie,* Vol. I, Ed. Tehnică, Bucureşti, 1987.

101. LEONTE M., FLOREA T. (1998). *Chimia alimentelor*, ed. Pax Aura Mundi, p. 360, Galaţi

102. Macrae, A.R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc,* **60,** 291-294.

103. Macrae, A.R. (1989). Tailored triacylglycerols and esters. *Biochem. Soc. Trans.* **17,** 1146-1148.

104. Maeda, H., Yamauchi, A., Suzuki, H. (1973). Preparation of immobilized enzymes by gamma-ray irradiation. *Biochim. Biophys. Acta,* **315,** 18-21.

105. Magearu, Vasile, 1988, *Controlul analitic al proceselor biotehnologice*, Ed. Tehnică, Bucureşti.

106. Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amudson, C.H. (1992). Kinetics and mechanism of reactions catalysed by immobilised lipases. *Enzyme Microb. TechnoL,* **14,** 426-446.

107. Margolin, A.L., Crenne, J.Y., Klibanov, A.M. (1987). Stereoselective oligomerization catalyzed by lipases in organic solvents. *Tetrahedron Lett.,* **28,** 1607-1610.

108. Marv, A., De Graaf, A.A., Wiechert, W., Eggeling, L., Gahm, H., *Biotechnol. Bioeng,* 49, 111-129, (1996).

109. May, S.W. (1992). Biocatalysis in the 1990s: a perspective. *Enzyme Microb.Technol.* **14,** 80-84.

110. Maylie, M.L., Charles, F., Sarda, L., Desnuelle, P. (1969). Action of organophosphates on pancreatic lipase. *Biochim. Biophys. Acta,* **178,** 196-198.

111. McNeill, G.P., Shimizu, S., Yamane, T. (1990). Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglvceride. *J. Am. Oil Chem. Soc,* **67,** 779-783.

112. McNeill, G.P., Shimizu, S., Yamane, T. (1991). High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J Am. Oil Chem. Soc,* **68,** 1-5.

113. McNeill, G.P., Yamane, T. (1991). Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc,* **68,** 6-10.

114. MENCINICOPSCHI G., (2006). *Nutrigenomica*, Planta Romanica nr. 13, pg. 18, Bucureşti

115. MENCINICOPSCHI G., ATUDOSIEI N., MENCINICOPSCHI C. – *Epigenetic factor – informational food matrix* – Planta Romanică, nr. 16, pg. 20 – 22, Bucureşti, 2007.

116. MENCINICOPSCHI G., RABA D. – *Siguranţa alimentară, autenticitate şi trasabilitate* – editura Mirton, p. 10 – 191, p. 275, Timişoara, 2005.

117. Morrow, C.J., Wallace, J.S. (1990). Synthesis of polyesters by lipase-catalyzed polycondensation in organic media, în *Biocatalysis* (editor Abramowicz, D.), Van Nostrand Reinhold, New York, 25-62.

118. Moskowitz, G.J., Cassaigne, R., West, I.R., Shen, T., Feldman, L.I. (1977). Hydrolysis of animal fat and vegetable oii with Mucor miehei esterase. Properties of the enzyme. *J. Agric. Food Chem.,* **25,** 1146-1150.

119. Mukataka, S., Kobayashi, T., Takahashi, J. (1985). Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. *J. Ferment. Technol,* **63,** 461-466.

120. Mukherjee, K.D. (1990). Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. *Biocatalysis,* **3,** 277-293.

121. Mukherjee, K.D., Kiewitt, I. (1991). Enrichment of y-linolenic acid from fungal oii by lipase-catalysed reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **35,** 579-584.

122. Mukherjee, K.H. (1995). Fractionation of fatty acids and other lipids via lipase-catalyzed reactions. *Ol. Corps Cras Lipides* **2,** 365-368.

123. Müller G. (1984). Das Pankreaslipase/Colipase-System. *Z ges. inn. Med.,* **39,** 321-325.

124. Müller K.P. (1977). Verfahren zur Herstellung eines lipasereichen Bnzymprăparates. *Brevet german* DE 2.716.719.

125. Muraoka, T., Ando, T., Okuda, H. (1982). Purification and properties of a novei lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *J.Biochem., 92,* 1933-1939.

126. Nagao, A., Kito, M. (1990). Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid esters useful in the food industry. *Biocatalysis,* **3,** 295-305.

127. Nakashima, T., Fukuda, FL, Nojima, Y., Nagai, S. (1989). Intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* using biomass support particles in a circulating bed fermentor. *J. Ferment. Bioeng.,* **68,** 19-24.

128. Nelson, J.M., Griffm, E.G. (1916). Adsorption of invertase. *J.Am.Chem.Soc,* **38,** 1109-1115.

129. Olsen, O., Thomsen, K.,K., *Cariberg Res. Commun* **54**, 29-39, (1989).

130. OLSHANSKY S.A. – *Potential decline în life expentansy în U.S.* – N. Engl. J. Med. 352:1138-45, 2005.

131. Olson, C, şi Cooney, L., *Immobilized enzymes infoodanimicrobialprocesses,* New York, Plenum Press, 1974.

132. Oniscu, C, *Tehnologia produselor de biosinteza,* Editura tehnică, 1978.

133. Oniscu, C., 1978. *Tehnologia produselor de biosinteză*, Ed. Tehnică, Bucureşti.

134. Orrenius, C, Ohmer, N.., Rotticci, D., Matison, A., Huit, K., Norin, T. (1995). *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolutions: substrate structure requirements for the preparation of enantiomerically enriched secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry.,* **6**, 1217-1220.

135. Palmer, D.C., Terradas, F. (1994). Regioselective enzymatic deacylation of sucrose octaacetate in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* **35**,1673-1676.

136. Peter, F., Preda, G. (2002). Characterisation of pancreatic lipase substrate specificity by a kinetic method. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic,* **19-20C,** 467-472.

137. Petri, A., Gambicorti, T., Salvadori, P. (2004). Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst. *J. Mol.Catal. B: Enzymatic,* **27**, 103-106.

138. Pierre, A.C. (2004). The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocat. Biotrans.,* **22,** 145-170.

139. Pina, M., Graille, J. (1983). Synthese enzymatique de glicerides partiels a partir de glycerol et d'acides gras. *Gattefosse Report* **76**, 34-36.

140. Piper, P.W., Kirk, N., *Genetically Engineered Proteins and Enzymes from yeasts,* Production Control, A. Wiseman, Ellis Horword, Leichester, UK, 147-189, (1991).

141. Reetz, M.T., Zonta, A. and Simpelkamp, J. (1996) Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnol. Bioeng.* **49,** 527-534.

142. Regulamentul CE 1924/2006/J. U.E. L404/30 dec. 2006.

143. Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J., *Yeast,* 8, 423-488, (1992).

144. Schmid, R.D., Verger, R (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.,* **37,** 1608-1633.

145. Scriban, R., *Biotechnologie*, 1993, Tec. Doc. Lavoisier, Paris.

146. Segal, Brad, Rodica, Segal, ş.a., *Tehnologia produselor alimentare de protecţie,* Ed. Ceres, Bucureşti.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

147. SETH LLOYD, JACK NG Y. (2004). *Computerele găuri negre*, Scientific American, ed. Lb. Română, nr. 12, p. 21 – 29, Bucureşti

148. Spencer, I., Spencer, D., *Yeasts Technology,* Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 3-65, (1994).

149. Valadi, H., Larsson, C, Gustafsson, *L.,Appl. MicrobioL Biotechnol,* **50,** 434-438, (1998).

150. WILSON J., HUNT T. (2004). *Biologie Moleculaire de la Cellule.* Flammarion, 33 – 325.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tiparul executat la

Imprimeria
MIRTON
Timişoara, str. Samuil Micu nr. 7
Tel.: 0256-225684, 0256-272926; Fax: 0256-208924
E-mail: mirton@mail.dnttm.ro www.mirton.ro

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN: 978-973-52-0422-8

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY